

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA



TESIS DOCTORAL

Acción del sulfuro de hidrógeno en la función de la vejiga urinaria

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Vítor Samuel Leite Fernandes

Directores

Medardo V. Hernández Rodríguez
Albino García Sacristán

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA



**ACCIÓN DEL SULFURO DE HIDRÓGENO EN
LA FUNCIÓN DE LA VEJIGA URINARIA**

TESIS DOCTORAL

VÍTOR SAMUEL LEITE FERNANDES

MADRID, 2015



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

Medardo Vicente Hernández Rodríguez, Profesor Titular de Fisiología y Albino García Sacristán, Catedrático de Fisiología, en la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICAN:

Que Don Vitor Samuel Leite Fernandes, Licenciado en Enfermería y Máster en Ciencias Farmacéuticas, ha realizado bajo nuestra dirección, el trabajo de investigación titulado "ACCIÓN DEL SULFURO DE HIDRÓGENO EN LA FUNCIÓN DE LA VEJIGA URINARIA" para optar al Grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

Madrid, 10 de Marzo de 2015

Prof. Dr. Medardo V. Hernández Rodríguez

Prof. Dr. Albino García Sacristán

*A los que buscan
aunque no encuentren.*

*A los que avanzan
aunque se pierdan.*

*A los que viven
aunque se mueran.*

Mario Benedetti.

A mis padres, mi hermano y hermana...

Y a ti AnaSofi.

*Defiende tu derecho a pensar,
porque incluso pensar de manera errónea
es mejor que no pensar.*

Hypatia de Alejandría

AGRADECIMIENTOS

A todos los que me han acompañado en la realización de esta Tesis Doctoral, quisiera dejar reflejado mi más sincera gratitud.

Quisiera dar las gracias, en primer lugar, a mi director de Tesis, el Profesor Medardo Hernández Rodríguez, por participar en sus proyectos de investigación antes de empezar con esta tesis. Darle las gracias por transmitirme sus conocimientos y rigor científico, que tanto le caracteriza, y sobre todo por apoyar y potenciar mi gusto por la investigación y docencia. Que el final de esta Tesis sea el comienzo de nuevos proyectos juntos. Y, por todo ello, espero un día corresponder y estar a tu altura. Simplemente ¡¡¡Gracias!!!

Al Profesor Dr. Albino García Sacristán, codirector de esta Tesis, quisiera agradecerle su excelente acogida en el Departamento de Fisiología y hacer tan fácil mi integración en este magnífico equipo. Gracias por todo el asesoramiento científico, consejos y apoyo que quedaran registrados en mi desarrollo profesional.

A la Dra. Elvira López-Oliva, por su colaboración con las técnicas de *Western Blot* y espectrofotometría del H₂S. ¡Gracias! por tus enseñanzas y estar siempre dispuesta a ayudar.

A la Dra. María Pilar Martínez, del Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas de la Facultad de Veterinaria de la UCM, por su gran labor con el estudio inmunohistoquímico. ¡Gracias! por su colaboración y por las valiosas enseñanzas con dicha técnica.

A los Profesores Dolores Prieto y Luis Rivera, por su cercanía, consejos y ayuda con la técnica de la medida simultánea de Ca²⁺ y tensión y *patch-clamp*. ¡Gracias! por los momentos de discusión científica que me ayudaron a desarrollar mi sentido crítico-científico.

Un reconocimiento especial a la Dra. Ana Sánchez, por lo que compartimos durante estos años de la Tesis. ¡Gracias! por tus enseñanzas, por tus consejos, por escucharme y

por tus palabras de ánimo y tu apoyo incondicional. ¡Gracias! por los momentos del café a media mañana, pero por encima de todo y de todo corazón, miles de gracias Anita, por haber estado siempre ahí.

A las Profesoras Paz Recio, Sara Benedito, Belén Climent por sus valiosas enseñanzas, por ayudarme, por escucharme, por su apoyo, pero sobre todo, gracias por vuestra amistad.

Un agradecimiento muy especial a la Dra. Cristina Martínez. ¡Muchísimas gracias! por tu sonrisa, tus palabras de ánimos, tu siempre buena disposición. Muchísimas gracias por tu actitud positiva que me viene enseñando a ver el lado positivo de las cosas. Ahora más que nunca, tu manera de ser tiene que estar por encima de todo, ¡¡¡TU ERES FUERTE!!!

A los Profesores del Departamento de Fisiología, por el buen recibimiento y por hacerme sentir como uno más durante estos años de mi Tesis, y no quisiera olvidarme de ninguno de vosotros. Gracias a los Drs. Ángel Agis, Rafaela Raposo y Emilia Muñoz.

A las Dras. Cristina Contreras y Ana Martínez-Sáenz. Cris y Aniuska, quisiera dejar bien reflejado y registrado mi más sincero agradecimineto por tantos momentazos inolvidables vividos... y que echo muchísimo de menos. Describirlos daría un libro por sí solo y no quiero ponerme pesado... no, no voy a ponerme pesado...¡¡¡Gracias, gracias y gracias!!!

A los Doctorandos Merche, Igor y Elvira. Quisiera daros las gracias por compartir estas experiencias y arrimar el hombro cada vez que se ha necesitado. ¡Gracias! por vuestro apoyo y ánimo en cada etapa durante la realización de esta Tesis.

A Macarena Martín, te escribo estas líneas en calidad de amigo. ¡¡Gracias!! Maqui, por haberme recibido en el Departamento cada mañana con una sonrisa, por tus bromas, y por romper la monotonía con tu particular manera de ser. Gracias por hacerme los días más coloridos. Tú eres mi *secre* favorita y yo ¿sigo siendo tu *portu* favorito? Y por

supuesto a tu chico, Jesús, que siempre tiene una palabra de confort cuando más se necesita. ¡Gracias! por vuestra amistad y por siempre haber estado ahí.

A Francisco Puente y Manuel Perales, no solo por vuestra excelente ayuda técnica, sino también por vuestra amistad. Gracias Paquito por compartir tantos momentos alegres y tantas sonrisas. Y a ti Manolo, te agradezco por tantas conversaciones y reflexiones que amenizaban la tarde. ¡Gracias! a vosotros por hacer el laboratorio un sitio más llevadero.

A la Dra. María Victoria Barahona del Departamento de Toxicología y Farmacología de la Facultad de Veterinaria. ¡Muchas gracias! por tu análisis crítico de los trabajos científicos, por tu cercanía y por todo el apoyo con la técnica de *patch-clamp* antes de irme a los Estados Unidos y todo ello hacerlo extensivo al Dr. Luis Olivos.

Al Dr. Luis Orensanz del Departamento de Investigación del Hospital Universitario Ramón y Cajal. ¡Gracias! por tu análisis crítico de nuestros trabajos, por compartir tus conocimientos, rigor científico y, en general, por tus enseñanzas y consejos, pero también, gracias por tu cercanía y amistad.

Al Dr. Salvador Bustamante, del Departamento de Urología del Hospital Universitario Puerta de Hierro de Majadahonda, por compartir su pasión por la investigación, por las discusiones e intercambios de ideas científicas que nos hace aprender y crecer profesionalmente.

To Prof. Georgi V. Petkov from the Department of Drugs Discovery and Biomedical Sciences, University of South Carolina, USA. Thanks for the training in electrophysiology. I would like to thanks all of your team as well, thanks to Dr. Shankar Prasad Parajuli, Dr. Kiril Hristov, Dr. John Malysz, Dr. Wenkuan Xin and, Aaron Provence.

A los *Portus*, Claudia, Luis, Angela y Vânia, y los eternos Dentes y Lopes. ¡Gracias! chicos por compartir momentos simplemente fantásticos y acompañarme en todo mi progreso. Gracias por vuestro hombro amigo, nunca me habéis faltado.

Y como no, a los *listos Avispados*, Lidi, Bea, Toño, la peque Daniela, José, Nerea, Violeta, Angela, David, Ricardo y Andrés. Gracias de todo mi corazón por vuestra confianza, por vuestro apoyo y por todos los momentos de alegría. Me habéis acompañado siempre, aquí y en Estados Unidos. Me he reído y llorado con vosotros. Siempre os llevaré en mi corazón...

A mi familia, mi *papy* y en especial a mi *mamy*, quisiera daros las gracias por todo lo que me habéis enseñado, por ello hoy he llegado aquí. Seguiré vuestro ejemplo para seguir adelante. A mi hermano y hermana, Paulo y Tânia, a pesar de nuestras diferencias ideológicas, siempre me habéis apoyado a vuestra manera, cuantas veces los actos resaltaron sobre el silencio de las palabras... y también, en ese silencio se me quedará corto mi manifiesto de gratitud. A Patricia y también a Tiago, gracias por todo el apoyo transmitido. Sin olvidar, quisiera dejar reflejado mi agradecimiento a Mafalda y Enzo, por la esperanza que me despiertan en el futuro.

Ana Sofia, quisiera darte las gracias por acompañarme en esta aventura. Este paso, muy importante para mí, es el cumplir de un sueño: hacerme un investigador... Con otras tantas cosas que podría haber hecho y he elegido este camino tan duro, tan difícil tortuoso a veces, muy arduo pero sin duda, tan gratificante a la vez. Y me has apoyado e incentivado en todos y cada uno de los momentos y claro está, en los más difíciles. Y me resulta difícil, llegados aquí, encontrar las palabras y los adjetivos para mostrarte toda mi gratitud, porque todos ellos me parecen muy corto. Así que, únicamente se me ocurre darte las gracias...miles y miles de gracias! Sencillo, pero es a mi manera.

Este trabajo de investigación ha sido financiado gracias a los Proyectos PS09/00044 del Ministerio de Ciencia e Innovación y PR6/13-18858 de la Universidad Complutense de Madrid (Santander-UCM), cuyo investigador principal es el Prof. Medardo Vicente Hernández Rodríguez.

Vitor Samuel Leite Fernandes ha disfrutado de una beca doctoral (SFRH/BD/68460/2010) de la “Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) do Ministério da Educação e Ciência (MEC)”, incluido en el “Programa Operacional de Potencial Humano (POPH)” inscrita en el “Quadro de Referência Estratégico Nacional (QREN)”.

FCT Fundação para a Ciência e a Tecnologia

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E CIÊNCIA



ABREVIATURAS

AC	Adenilato ciclasa
ACh	Acetilcolina
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
APSC	Aferentes primarias sensibles a capsaicina
ATP	Trifosfato de adenosina
BK _{Ca}	Canales de potasio activados por calcio de alta conductancia
CBS	Enzima cistationina β -sintasa
CGRP	Péptido relacionado con el gen de la calcitonina
CICs	Células Intersticiales de Cajal
C-kit	Receptor tirosina-cinasa
CO	Monóxido de carbono
COX	Ciclooxigenasa
CSE	Enzima cistationina γ -liasa
DAG	Diacilglicerol
ET	Endotelina
GMPc	Guanosina monofosfato cíclico
5-HT	Serotonina
H ₂ S	Sulfuro de Hidrógeno
IUE	Incontinencia Urinaria de estrés
IUU	Incontinencia Urinaria de urgencia
IK _{Ca}	Canales de potasio activados por calcio de conductancia intermedia
InsP ₃	Inositol trifosfato
IU	Incontinencia Urinaria
K _{Ca}	Canales de potasio activados por calcio
K _{ATP}	Canales de potasio dependientes de ATP
K _v	Canales de potasio dependientes de voltaje
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógeno
MLC	Cadena ligera reguladora de miosina
MLCK	Cinasa de la cadena ligera de miosina
MLCP	Fosfatasa de la cadena ligera de miosina
NANC	No adrenérgico no colinérgico
NKA	Neurocinina A
NKB	Neurocinina B

NO	Óxido nítrico
NOS	Enzima de síntesis de óxido nítrico
NOS _e	Enzima de síntesis de óxido nítrico endotelial
NOS _i	Enzima de síntesis de óxido nítrico inducible
NOS _n	Enzima de síntesis de óxido nítrico neuronal
PAC ₁	Receptor específico de PACAP
PACAP	Péptido activador de la adenilato ciclasa hipofisiario
PDEs	Fosfodiesterasas
PGs	Prostaglandinas
PKA	Proteína cinasa dependiente del AMPc
PKC	Proteína cinasa C
PKG	Proteína cinasa dependiente de GMPc
PLC	Fosfolipasa C
Rho	Cinasa específica
Rhok	Rho-cinasa asociada
ROC	Canales de calcio activados por receptor
RS	Retículo sarcoplásmico
RVU	Reflujo Vésicoureteral
SK _{Ca}	Canales de potasio activados por calcio de baja conductancia
SNA	Sistema Nervioso Autónomo
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	Sistema Nervioso Periférico
SOC	Canales de calcio operados por depósito
SP	Sustancia P
STUI	Sintomas del Tracto Urinario Inferior
TKs	Taquicininas
TRP	Receptores vaniloides
TRPA1	Receptor de potencial transitorio canal catiónico, subtipo A1
TRPV1	Canal iónico de la familia de receptores vaniloides
VIP	Péptido intestinal vasoactivo
VOC	Canales de calcio dependientes de voltaje

ÍNDICE

I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	1
1. TRACTO URINARIO	3
1.1. ANATOMÍA	3
1.2. FISIOLÓGÍA DE LAS VÍAS URINARIAS	6
1.3. REGULACIÓN DEL MÚSCULO LISO.....	11
1.3.1. Regulación de las proteínas contráctiles	11
1.3.2. Actividad eléctrica y canales iónicos	13
1.3.3. Actividad miogénica.....	22
1.4. REGULACIÓN COLINÉRGICA Y ADRENÉRGICA.....	23
1.5. REGULACIÓN NO ADRENÉRGICA NO COLINÉRGICA (NANC).....	27
1.6. CÉLULAS INTERSTICIALES	35
1.7. PAPEL DEL UROTELIO/SUBUROTELIO EN LA FUNCIÓN DE LA VEJIGA URINARIA	36
2. SULFURO DE HIDRÓGENO (H ₂ S).....	40
2.1. BIOSÍNTESIS Y METABOLISMO DEL H ₂ S.....	40
2.2. INTERACCIONES DE GASES NEUROTRANSMISORES	43
2.3. H ₂ S Y CANALES IÓNICOS	44
2.4. ACCIÓN BIOLÓGICA DEL H ₂ S	46
2.4.1. Sistema Cardiovascular.....	46
2.4.2. Sistema Respiratorio	49
2.4.3. Sistema Gastrointestinal	50
2.4.4. Tracto Urinario	51
2.4.5. Otros efectos fisiológicos	51
2.5. POTENCIAL TERAPÉUTICO DEL H ₂ S.....	52
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	55
III. MATERIAL Y MÉTODOS	65
1. MATERIAL BIOLÓGICO.....	67
2. PROTOCOLO EXPERIMENTAL	68
IV. RESULTADOS	77
1. PAPEL DEL H ₂ S EN LA NEUROTRANSMISIÓN INHIBIDORA DEL URÉTER INTRAVESICAL.....	79
1.1. EXPRESIÓN DE LAS ENZIMAS CSE Y CBS	79
1.2. ESTUDIOS FUNCIONALES.....	80
1.2.1. Efecto del bloqueo de la CSE y CBS	80
1.2.2. Efecto del GYY4137 y del bloqueo de la NOS y de la CSE en la producción endógena de H ₂ S.....	84

1.2.3.	<i>Efecto del bloqueo de la GCs, PKA, COX y de los canales K_{ATP}</i>	84
1.2.4.	<i>Efecto de la desensibilización de las APSC y de los canales TRPA1 y TRPV1 ..</i>	86
1.2.5.	<i>Efecto del bloqueo de los receptores VIP/PACAP y CGRP</i>	87
2.	PAPEL DEL H_2S EN LA NEUROTRANSMISIÓN INHIBIDORA DEL CUELLO VESICAL	88
2.1.	EXPRESIÓN DE LAS ENZIMAS CSE Y CBS	88
2.2.	ESTUDIOS FUNCIONALES	89
2.2.1.	<i>Efecto del bloqueo de canales de Na^+ neuronales y de las enzimas CSE y CBS ..</i>	89
2.2.2.	<i>Efecto del bloqueo de la GCs, PKA y canales de K^+</i>	92
2.2.3.	<i>Efecto de la desensibilización de las APSC y del bloqueo de canales TRPA1 y TRPV1</i>	95
2.2.4.	<i>Efecto del bloqueo de receptores VPAC, CGRP y prostanóides</i>	100
2.3.	REGISTRO SIMULTÁNEO DE Ca^{2+} Y TENSIÓN	103
V.	DISCUSIÓN	105
VI.	CONCLUSIONES	121
VII.	BIBLIOGRAFÍA	125
VIII.	ABSTRACT	149

I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. TRACTO URINARIO

1.1. ANATOMÍA

El Tracto Urinario está constituido por un conjunto de conductos y reservorios que participan en el transporte, el almacenamiento y la eliminación periódica de orina. Así, de su estructura, forman parte dos uréteres, una vejiga y una uretra que conduce la orina al meato urinario para su expulsión al exterior.

Los uréteres son dos finos conductos músculo-membranosos que se originan en la porción inferior de la pelvis renal y terminan en la base de la vejiga urinaria. Presentan una longitud de 25 a 30 cm y un diámetro variable comprendido entre 4 y 7 mm. Los uréteres discurren lateralmente a las venas gonadales, apoyados sobre la pared muscular abdominal y antes de penetrar en la cavidad pélvica, cruzan lateralmente los vasos iliacos, iniciándose su trayecto pélvico. En el varón, los uréteres pasan por debajo de los conductos deferentes, mientras que en la mujer discurren por debajo de las arterias uterinas. En un corte transversal, la pared del uréter, según su morfología, consta de tres capas diferenciadas: la túnica mucosa, la túnica muscular y la túnica serosa (Figura I). La túnica mucosa, está constituida por diferentes estratos celulares, el epitelio de transición y la lámina propia, y tiene la capacidad de adaptar la mucosa a los cambios de volumen de orina que discurre por el uréter. La túnica muscular presenta una capa longitudinal interna, una capa circular externa y en el extremo inferior aparece una tercera capa longitudinal. Al penetrar en la vejiga, la porción distal del uréter adquiere una dirección oblicua a la pared vesical diferenciándose en ella tres segmentos: yuxtavesical, intramural y submucoso. La capa serosa o adventicia está constituida por fibras colágenas y elásticas, dispuestas laxamente junto a cantidades variables de tejido adiposo alrededor de la periferia (Desgrandchamps *et al.*, 1997).

La vejiga urinaria forma un saco músculo-membranoso cuya función es recoger, almacenar y eliminar periódicamente la orina. Se sitúa en el hueco pélvico, por encima del diafragma pelviano, el cual está constituido por los músculos elevadores del ano, el isquiocavernoso, el bulbocavernoso, los transversos superficial y profundo y los esfínteres estriados de la uretra y del ano. Está recubierta por el peritoneo parietal en la parte superior que continúa como lámina parietal anterior en la cara ventral. La vejiga se divide en dos componentes principales: el cuerpo, que corresponde a la porción superior

a los orificios ureterales; y la base, constituida por el trígono y el cuello vesical (Drake *et al.*, 2010).

A semejanza del uréter, la vejiga urinaria presenta tres capas diferenciadas (Figura II). La mucosa, representa la capa más interna de la vejiga y está formada por epitelio de transición urinario (urotelio) que es un epitelio estratificado impermeable a la orina, y por la lámina propia. La capa muscular está formada por músculo liso y presenta una capa longitudinal interna, una capa circular media y una capa longitudinal externa. En la parte superior, estas tres capas musculares se entremezclan y sus fibras cambian de orientación y plano adquiriendo una disposición ideal para permitir un buen vaciamiento vesical. En el cuello de la vejiga estas tres capas de fibras están bien definidas y se continúan en dirección a la uretra formando el denominado esfínter interno liso (Drake *et al.*, 2010).

La uretra es un conducto fibromuscular que se extiende desde el cuello de la vejiga hasta el meato urinario externo. Su longitud es variable según el sexo (aproximadamente 4 cm en la mujer y 16 cm en el varón, Figura II) y su función es la de conducir la orina desde la vejiga al exterior. En el varón, además, participa en el transporte de semen. La pared uretral está formada por una capa muscular lisa interna con fibras de disposición longitudinal y transversal. El músculo liso uretral desciende caudalmente ocupando gran parte de la uretra. La capa muscular externa está constituida por fibras estriadas. Dicho músculo estriado alcanza su máximo grosor, en los dos tercios centrales de la uretra, formando un anillo y constituyendo el denominado esfínter uretral externo de control voluntario. El cierre de la uretra es debido a la presencia de dos esfínteres, uno interno de control involuntario y otro externo de control voluntario. Además de las estructuras musculares, la uretra presenta una capa mucosa interna y la adventicia que recubre externamente la uretra (Drake *et al.*, 2010).

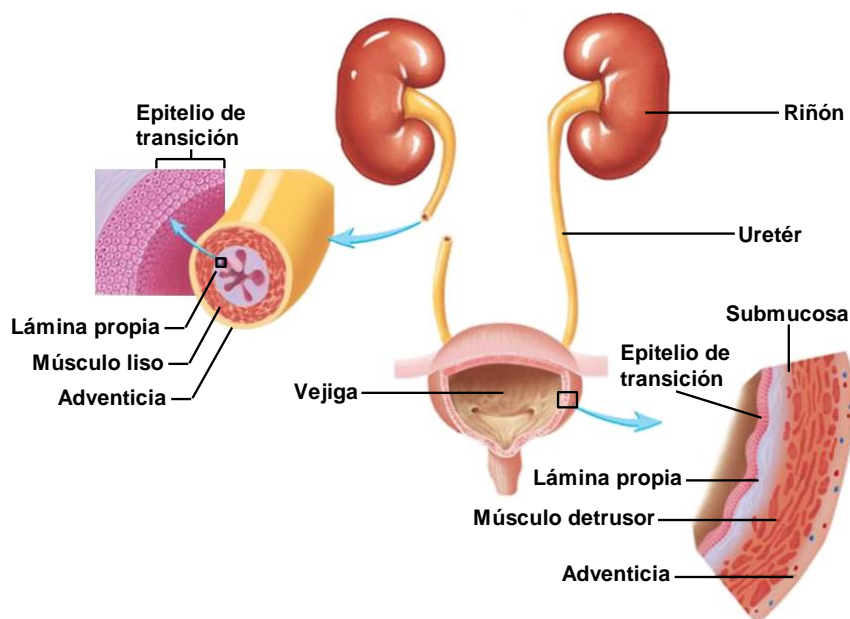


Figura I. Esquema representativo de las capas de la pared ureteral y vesical. La pared vesical está constituida por tres capas principales bien diferenciadas: la túnica mucosa, túnica muscular y túnica serosa (Mesher, 2009).

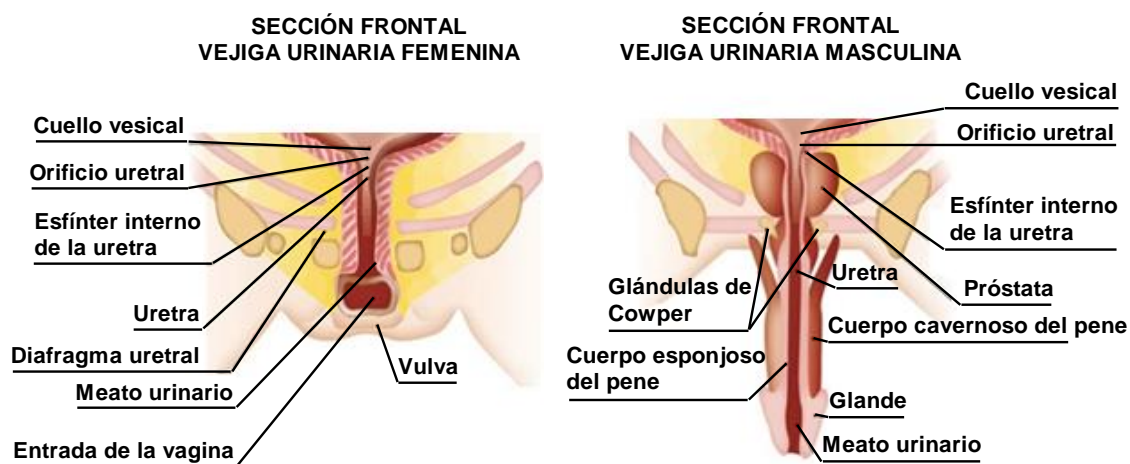


Figura II. Estructura anatómica de la uretra femenina y masculina. La uretra femenina mide aproximadamente 4 cm de longitud mientras que la uretra masculina tiene aproximadamente 16 cm.

1.2. FISIOLÓGÍA DE LAS VÍAS URINARIAS

La orina formada en el riñón desciende en forma de gota o bolo urinario, a través del uréter hasta alcanzar la vejiga, gracias en parte a una actividad peristáltica. Dicho peristaltismo se inicia en la pelvis renal y se propaga, de forma rítmica, a través de la pared del uréter hasta la vejiga urinaria. Dicha actividad contráctil es generada por células marcapasos que se localizan en las regiones del sistema colector calicial cercano a la pelvis renal (Lang *et al.*, 2006; Rasouly & Lu, 2013). Dicho marcapasos está integrado por células musculares lisas *atípicas* que poseen una escasa red de filamentos contráctiles y una débil expresión de la actina α del músculo liso. Las células *atípicas* de músculo liso se encuentran principalmente en la región más proximal de la pelvis renal y son morfológicamente similares a las de las células marcapasos cardíacas (Lang *et al.*, 2010; Rasouly & Lu, 2013). El otro tipo de células marcapasos son las denominadas *Células de Cajal*, que se caracterizan por presentar prolongaciones citoplasmáticas finas y largas y se asemejan a las *Células Intersticiales de Cajal* del intestino (Metzger *et al.*, 2004; Rasouly & Lu, 2013). Las células marcapasos producen una señal eléctrica de forma pulsátil y regular que se transmite a través de las células musculares lisas de la capa muscular ureteral (Lang *et al.*, 2006; Rasouly & Lu, 2013). La actividad marcapasos intrarrenal, es coordinada por la unión pieloureteral, y permite el bloqueo de las contracciones generadas a nivel calicial, así como su propagación al uréter facilitando el transcurso unidireccional del bolo de orina (Lang *et al.*, 2002; Rasouly & Lu, 2013).

El peristaltismo generado por las células marcapasos puede ocurrir sin inervación, aunque el Sistema Nervioso Autónomo (SNA) desempeña un papel modulador del tono ureteral. El uréter recibe inervación nerviosa autónoma que deriva de los plexos renales, aórtico, hipogástrico anterior y pelviano (Lang *et al.*, 2002). La densidad nerviosa autónoma se incrementa de forma progresiva desde la pelvis renal hacia la vejiga, por lo que segmentos distales presentan una mayor presencia de fibras autónomas, lo que sugiere un importante papel del SNA en la regulación del tono muscular a este nivel (Chaparro *et al.*, 2002; Lang *et al.*, 2002). La inervación simpática deriva de fibras preganglionares toracolumbar T11-L2, mientras que la parasimpática proviene de plexos nerviosos de los segmentos sacros S2-S4. La porción distal del uréter presenta una inervación intrínseca, representada por fibras simpáticas y parasimpáticas y una inervación extrínseca constituida por un plexo vegetativo fundamental formado por

fibras amielínicas que atraviesan la pared ureteral con fibras nerviosas simpáticas y parasimpáticas (Chaparro *et al.*, 2002).

Las fibras posganglionares colinérgicas son más abundantes que las adrenérgicas y se hacen más densas a medida que el uréter penetra en la pared de la vejiga. La estimulación colinérgica de la pared uréteral incrementa la actividad contráctil y el tono basal de la musculatura lisa (Hernández *et al.*, 1993; Prieto *et al.*, 1994; Canda *et al.*, 2007). Asimismo, la activación de receptores adrenérgicos α , incrementa el peristaltismo del uréter y eleva las presiones dentro de la luz ureteral, mientras que receptores adrenérgicos β disminuyen la frecuencia peristáltica y las presiones intramurales (Hernández *et al.*, 1992; Canda *et al.*, 2007). Estos mecanismos trabajan de forma sinérgica favoreciendo el paso unidireccional del bolo de orina a la vejiga (Canda *et al.*, 2007).

En la vejiga, la orina se va acumulando hasta alcanzar un dintel de llenado. El reflejo miccional es mediado por una vía espinobulboespinal que coordina la actividad del centro pontino de la micción y de la sustancia gris periacueductal del tronco del encéfalo. El detrusor, el trigono y la uretra reciben innervación aferente del plexo autonómico hipogástrico y pelviano, de naturaleza simpática y parasimpática, respectivamente, mientras que el esfínter estriado externo y el suelo perineal está innervado por ramas sensitivas y motoras del nervio pudendo interno de naturaleza somática (Fowler *et al.*, 2008; Hernández & Bustamante, 2010) (Figura III).

La médula espinal recibe influencias de niveles superiores del Sistema Nervioso Central (SNC) (tronco del encéfalo, centros extrapiramidales, tálamo y corteza cerebral parietal y frontal), por lo que la regulación ejercida por el SNA es modulada por centros medulares y encefálicos de forma antagónica, una vez que la activación simpática y parasimpática favorece el llenado y vaciado vesical, respectivamente (de Groat & Wickens, 2013; Seth *et al.*, 2013).

Las fibras parasimpáticas preganglionares (colinérgicas) que emergen del núcleo intermediolateral con origen en los segmentos medulares S2-S4, se introducen en el plexo hipogástrico a través de los nervios espláncnicos pelvianos. Estos axones discurren por el plano anterior en dirección al interior del plexo vesical para terminar en las neuronas ganglionares ubicadas en la pared vesical. Los axones posganglionares (colinérgicos y purinérgicos) proporcionan innervación motora a todas las partes de la pared de la vejiga. La estimulación parasimpática durante la micción activa el detrusor e inhibe el trigono a la vez que ejerce un efecto relajante sobre la musculatura lisa de la uretra a través de la liberación de NO (Yoshimura & Chancellor, 2003; Fowler *et al.*,

2008). Del asta anterior de los segmentos sacros S2-S4 (*núcleo de Onuf*), abandonan axones de naturaleza somática a través del nervio pudendo y terminan en el músculo estriado del esfínter uretral externo. La activación somática lleva a la contracción y cierre del esfínter uretral externo (Fowler *et al.*, 2008; de Groat & Wickens, 2013; Seth *et al.*, 2013) (Figura III).

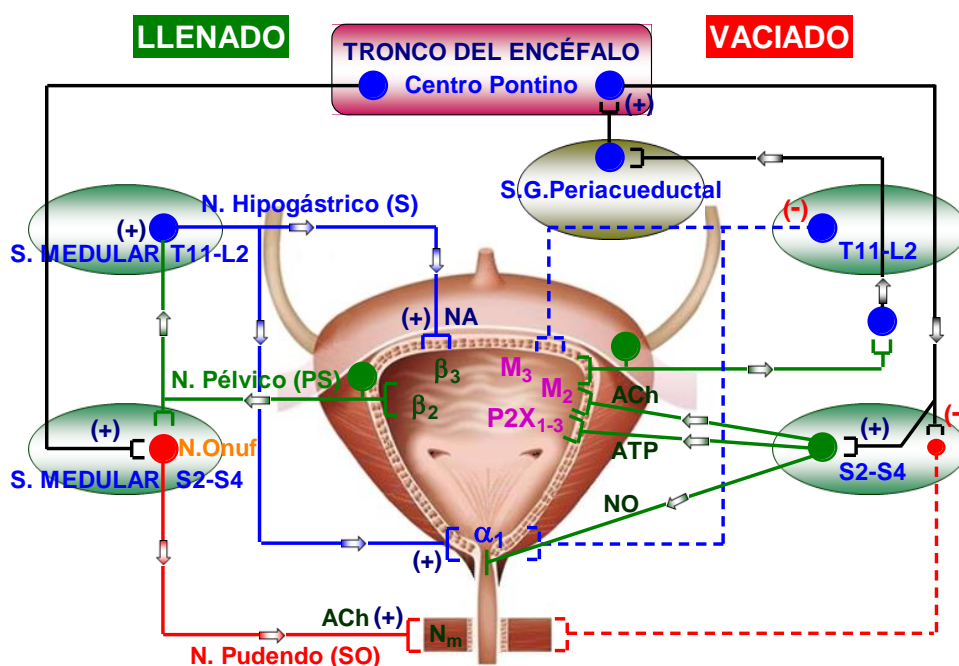


Figura III. Neurofisiología de la fase de llenado y vaciado vesical. Durante la fase de llenado, la distensión de la pared vesical activa la rama sensitiva del nervio pélvico, constituida por fibras nerviosas aferentes tipo III Aδ. Esta señal da lugar a la activación del núcleo de Onuf (S2-S4) y del núcleo intermediolateral de los segmentos medulares T11-L2. La estimulación somática facilita la liberación de ACh produciéndose la contracción del esfínter uretral externo vía receptores nicotínicos, mientras que la activación del plexo simpático facilita la liberación de NA causando relajación del detrusor vía receptores β_3 y β_2 y contracción del esfínter uretral interno, vía receptores adrenérgicos α_1 . Cuando la vejiga alcanza un dintel de llenado, el centro pontino de la micción activa el núcleo parasimpático S2-S4 el cual, a través del nervio pélvico, induce la contracción del detrusor, mediante la liberación de ATP y ACh vía activación receptores vesicales P2X₁₋₃ y M₃ y M₂, respectivamente y la relajación del esfínter interno mediada por NO. Asimismo, esta señal inhibe la actividad somática, produciendo la relajación del esfínter uretral externo. La contracción del detrusor, junto con la relajación involuntaria del esfínter interno y la voluntaria del esfínter externo dan lugar a un vaciado completo de la vejiga. Adaptado de (Hernández & Bustamante, 2010).

Las fibras preganglionares simpáticas provienen del núcleo intermediolateral de los segmentos medulares T11-L2. Dejan el tronco simpático cursando a través de los nervios espláncnicos lumbar y sacro, ingresan en el plexo hipogástrico inferior y terminan en los ganglios prevertebrales. Los axones posganglionares simpáticos (adrenérgicos) discurren por el nervio hipogástrico inferior y proporcionan inervación a la musculatura lisa del cuello vesical y de la uretra. La estimulación simpática facilita la contracción del cuello vesical y de la uretra proximal (esfínter interno) y la relajación del músculo detrusor permitiendo la distensión de la vejiga durante la fase de llenado (Yoshimura & Chancellor, 2003; Fowler *et al.*, 2008; de Groat & Wickens, 2013). Las aferentes vesicales viajan por encima de los nervios espláncnicos lumbar, pelviano y del nervio pudendo y alcanzan la médula en los segmentos L1-L2 y S2-S4. Esta inervación sensorial está integrada por fibras ligeramente mielinizadas tipo III A δ y por fibras amielinizadas tipo IV C de localización más dispersa en el musculo liso y urotelio. Las aferentes sensoriales del nervio pélvico monitorizan el volumen de la vejiga durante la fase de llenado, así como la amplitud de las contracciones vesicales durante la micción (Yoshimura & Chancellor, 2003; de Groat & Yoshimura, 2009).

Durante la fase de llenado vesical, la orina produce una distensión de la pared vesical que se va acomodando al incremento del volumen de orina, sin que se perciba un aumento significativo de la presión intravesical, por lo que la percepción de llenado no se hace consciente hasta alcanzar su capacidad máxima fisiológica. La distensión de la vejiga origina estímulos aferentes del arco reflejo de la micción. Dicho estímulo, constituye la señal que es transmitida en forma de impulsos nerviosos a través de las fibras nerviosas aferentes tipo III A δ hasta los segmentos medulares sacros S2-S4 (*núcleo de Onuf*), activando motoneuronas del nervio pudendo y produciendo liberación de ACh que causa contracción vía receptores nicotínicos y por tanto, el cierre del esfínter uretral externo. Simultáneamente, estas aferentes activan los centros motores simpáticos de los segmentos toracolumbares T11-L2, que liberan NA desde el plexo hipogástrico, produciendo la relajación del detrusor a través de receptores β_3 y β_2 y contracción del esfínter interno vía receptores α_1 . Esos mecanismos ocurren de forma coordinada favoreciendo la continencia vesical (Yoshimura & Chancellor, 2003; Andersson & Wein, 2004; Fowler *et al.*, 2008). Un incremento repentino de la presión intravesical lleva a la activación del denominado *Reflejo de Almacenaje Adicional*, también conocido "*Efecto Guardián*" (Figura IV). Esta señal genera la activación parasimpática del nervio pélvico que provoca la liberación de serotonina (5-HT) y NA desde el núcleo de Onuf

produciendo la activación somática del nervio pudendo y una rápida y potente contracción colinérgica de la musculatura estriada del esfínter uretral externo, evitando así el escape de orina (Hernández & Bustamante, 2010; Sadananda *et al.*, 2011).

Cuando la vejiga alcanza su volumen umbral (entorno a 200 mL), surge la sensación de llenado y deseo miccional, señal que se va incrementando hasta alrededor de 350 ml. Si la situación es la adecuada y de forma consciente se decide iniciar el vaciamiento vesical, la zona extrapiramidal del encéfalo envía estímulos nerviosos al hipotálamo que son conducidos a un centro de la parte superior de la protuberancia que activa el núcleo parasimpático medular sacro el cual, a través del nervio pélvico, produce la contracción del detrusor mediante la liberación de ACh y ATP que estimula los receptores muscarínicos M_3 y M_2 , y purinérgicos $P2X_1$, del detrusor. Además, esta señal causa la relajación del cuello vesical y de la uretra proximal a través de la liberación de NO. El centro pontino de la micción también envía impulsos al *núcleo de Onuf* que inhibe la actividad del nervio pudendo y relajando el esfínter urteral externo. Asimismo, las señales de la protuberancia inhiben la actividad simpática en la vejiga y uretra, favoreciendo el vaciado vesical (Andersson & Wein, 2004; Fowler *et al.*, 2008).



Figura IV. Reflejo de almacenaje adicional. La elevación súbita de la presión vesical estimula la liberación de 5-HT y NA desde el *núcleo de Onuf* y consecuente activación del nervio pudendo que libera ACh produciendo la contracción del rabdoesfínter y la retención urinaria. Adaptación de (Hernández & Bustamante, 2010).

En caso de que se decida voluntariamente posponer el vaciado vesical, el lóbulo frontal envía señales al hipotálamo donde se inhiben los impulsos facilitadores parasimpáticos y se estimula la simpática. Desde ahí, se envían señales al Tracto Urinario Inferior para contraer el rhabdósfinter y evitar así la pérdida de orina. La micción se puede posponer temporalmente, sin embargo, a medida que se acumula más orina, la sensación de micción se vuelve imperiosa y se produce la micción. Tras el vaciamiento vesical, comienza un nuevo ciclo miccional (Yoshimura & Chancellor, 2003; Andersson & Wein, 2004).

1.3. REGULACIÓN DEL MÚSCULO LISO

1.3.1. Regulación de las proteínas contráctiles

El músculo liso vesical está formado por células uninucleadas en forma de huso y organizadas en fascículos de fibras musculares rodeadas por vainas de tejido conectivo. Su citoplasma celular presenta filamentos contráctiles compuesto por filamentos delgados de actina α y β que se unen a cuerpos densos de la membrana celular. Los filamentos delgados proporcionan el sitio de unión para los filamentos gruesos. En el músculo liso existen cuatro tipos de isoformas de miosina (SM1A, SM1B, SM2A, SM2B) con diferentes propiedades contráctiles, siendo en las vejigas de adultos, las isoformas SM1B y SMSM2B las más abundantes (Martin *et al.*, 2007).

La contracción de la musculatura lisa es regulada por el aumento en los niveles citosólicos de Ca^{2+} , para favorecer los enlaces cruzados entre la actina y la miosina a través de la formación del denominado *Complejo Ca^{2+} -calmodulina* para la activación de la cinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK) y consecuente fosforilación de las cabezas ligeras de la miosina (Andersson & Arner, 2004). Las proteínas caldesmón y calponina también forman parte de los filamentos delgados. El caldesmón podría estar involucrado en la regulación cooperativa de la formación de puentes cruzados entre la actina y miosina, sin embargo, su papel en la vejiga urinaria no está aún bien definido. Por otro lado, la calponina podría estar implicada en el tiempo de progreso de la tensión muscular lisa, una vez que la eliminación del gene de calponina h1 produce un desarrollo más rápido de la contracción muscular lisa de la pared vesical (Fujishige *et al.*, 2002).

En reposo, las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} son de $0.1 \mu\text{M}$. La formación de enlaces cruzados entre la actina y miosina para producirse la contracción muscular, requiere un incremento de $10\text{-}100 \mu\text{M}$ de Ca^{2+} que proviene tanto del medio extracelular, involucrando canales de Ca^{2+} dependientes (tipo L) e independientes de voltaje, así como desde el retículo sarcoplásmico (RS) (Fry *et al.*, 2002). El Ca^{2+} se une a la calmodulina, formando el *Complejo Ca^{2+} -calmodulina* facilitando así la activación de la MLCK. Esta cinasa, una vez activada fosforila la cadena ligera reguladora de miosina (MLC) que lleva a la formación de puentes cruzados actina-miosina y contracción muscular (Fry *et al.*, 2002; Ding *et al.*, 2009).

El cese de la contracción muscular ocurre como consecuencia del descenso de las concentraciones citosolicas de Ca^{2+} , producida por la recaptación de Ca^{2+} por el RS en consecuencia de la actividad de la bomba SERCA y por la actividad del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de la membrana celular que retira Ca^{2+} al espacio extracelular en contra de su gradiente de concentración. De esta manera, la disminución de las concentraciones de Ca^{2+} , inhibe la actividad de la MLCK (Ding *et al.*, 2009). Asimismo, la desfosforilación de la MLC por la fosfatasa de la cadena ligera de miosina (MLCP) juega un papel importante en la contractilidad del músculo liso vesical. El ciclo de puentes cruzados se producirá mientras la cabeza de miosina es fosforilada. Por tanto, la cinasa activadora (MLCK) y la fosfatasa inactivadora (MLCP) son las principales vías reguladoras de la contracción y relajación muscular lisa, respectivamente (Somlyo & Somlyo, 2003).

Una disminución de la actividad de la MLCP a través de mecanismos independientes de Ca^{2+} , así como un incremento de la misma, podría resultar en una sensibilización al Ca^{2+} . Mientras que, una actividad incrementada de la MLCP por mecanismos independientes al Ca^{2+} , o una disminución de su actividad prodría conducir a una desensibilización al Ca^{2+} (Somlyo & Somlyo, 2003). Así, los agonistas fisiológicos además de modificar las concentraciones de Ca^{2+} intracelular alteran la sensibilidad de la maquinaria contráctil al Ca^{2+} . Una de las principales vías para la inhibición de la MLCP que produce la sensibilización al Ca^{2+} , involucra una cinasa específica, la Rho-cinasa asociada (Somlyo & Somlyo, 2003). Las Rho-cinasas son activadas por el paso de GDP a GTP, cuyo proceso es controlado por otras proteínas como GDI, GAP y GEF. En el músculo liso relajado, la Rho citosólica se encuentra bajo la forma de complejo Rho-GDP-GDI y una vez activada, por acción de la Rho-GEF, en presencia de GTP, sufre translocación a la membrana celular (Gong *et al.*, 1997). La Rho activa la Rho-cinasa asociada (RhoK) que a su vez fosforila la miosina conjugada de la MLCP, inhibiéndola

produciendo la sensibilización al Ca^{2+} en la contracción del músculo liso (Kimura *et al.*, 1996). La vejiga urinaria contiene ambas isoformas de la RhoK (RhoK I y RhoK II). Bloqueantes de la RhoK I y RhoK II, inhiben la contracción inducida por la ACh de la vejiga urinaria, demostrando el importante papel de la vía de la Rho cinasa en el acoplamiento excitación-contracción mediada por receptores muscarínicos en la vejiga urinaria (Jezior *et al.*, 2001).

PKA y PKG, las proteínas cinasas dependientes del GMPc y del AMPc, respectivamente, fosforilan Rho inhibiendo su acción de sensibilización al Ca^{2+} , inhibiendo, por tanto, la contracción inducida por Ca^{2+} y produciendo relajación de la musculatura lisa de la pared vesical (Sauzeau *et al.*, 2000).

1.3.2. Actividad eléctrica y canales iónicos

Potencial de membrana en reposo y potencial de acción

El músculo liso de la vejiga urinaria es un tejido con propiedades electrofisiológicas capaz de generar potenciales de acción espontáneos e inducidos (Fry *et al.*, 1998; Sui *et al.*, 2001). Los potenciales de acción espontáneos están asociados a bajas ondas de despolarización y se muestran como espigas aisladas a intervalos regulares y, ocasionalmente, como ráfagas de espigas (Andersson & Arner, 2004). La frecuencia de estos potenciales es dependiente del voltaje, de forma que la despolarización incrementa la frecuencia de disparo y la hiperpolarización la disminuye, estando relacionados con incrementos del Ca^{2+} intracelular. No obstante, la liberación de Ca^{2+} del RS, puede amplificar el incremento del Ca^{2+} citosólico asociado a potenciales de acción. Así, estas elevaciones producen la propagación de los potenciales de acción a otras fibras musculares a través de *uniones gap*, sin prácticamente encontrar resistencia alguna a su paso (Hashitani & Brading, 2003).

Las células de la musculatura lisa ureteral presentan potenciales de acción espiga repetitivas sobre la fase de meseta (-20 mV), que resultan de la coordinada activación repetitiva de las corrientes de Ca^{2+} y de las corrientes de K^{+} dependientes de Ca^{2+} . La fase de meseta es mantenida por una inactivación lenta de las corrientes de Ca^{2+} en combinación con una entrada tardía dependiente de Na^{+} . Las corrientes de salida transitorias independientes de Ca^{2+} son generalmente pequeñas y no tienen significado

funcional como corrientes repolarizantes. Sin embargo, un incremento gradual en la concentración basal repolariza la célula al potencial de membrana en reposo (Imaizumi *et al.*, 1990).

El músculo detrusor presenta una gran variedad en los valores de potencial de membrana en reposo, dependiendo de la especie (conejo: -37mV, rata: -47mV, cobaya: -40mV, hombre: de -47 a -55mV) (Brading, 1992). El incremento de las corrientes de Ca^{2+} activa los potenciales de acción y despolariza la membrana de la célula muscular lisa conduciendo al incremento de las concentraciones de Ca^{2+} citosólico y produciendo la contracción. Por otro lado, la fase de repolarización es mediada por la activación de corrientes de salida de K^{+} e inactivación de las corrientes de Ca^{2+} (Hashitani & Brading, 2003; Hashitani *et al.*, 2004).

Canales de Ca^{2+}

El Ca^{2+} juega un papel elemental en la despolarización eléctrica de la membrana y en el proceso de excitación-contracción de la célula muscular lisa. El incremento en la concentración citosólica de Ca^{2+} es consecuencia del influjo de Ca^{2+} extracelular y/o de la liberación de Ca^{2+} del RS (Brading & Brain, 2011). La membrana de la célula muscular lisa de la vejiga urinaria expresa varios tipos de canales permeables al Ca^{2+} , como son los denominados canales de Ca^{2+} operados por voltaje (VOC) y canales operados por ligando (Brading & Brain, 2011). Los principales canales VOC son los del tipo L, que se caracterizan por presentar una activación a potenciales de membrana alrededor de -40 mV y generar corrientes de Ca^{2+} de larga duración. La entrada de Ca^{2+} que activa la contracción muscular durante la despolarización de la membrana celular, procede de los canales VOC tipo L, así como de la liberación de Ca^{2+} del RS. Por tanto, dichos canales contribuyen a la contracción del músculo liso mediando el influjo de Ca^{2+} extracelular y estimulando la liberación de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares (Berridge *et al.*, 2003). Tanto en el uréter (Lang *et al.*, 2010) como en el detrusor (Berridge *et al.*, 2003; Chow *et al.*, 2003), el influjo de Ca^{2+} extracelular a través de los canales VOC tipo L, representa el acontecimiento principal en los cambios mediados por la despolarización y por consiguiente en la generación de la contracción de la fibra muscular lisa. En el cuello de la vejiga urinaria, la activación de canales VOC tipo L incrementa el tono de la musculatura lisa lo que sugiere la importancia de estos canales en la regulación de la contractilidad de la zona de salida (Fernandes *et al.*, 2012; Fernandes *et al.*, 2014b).

La implicación de otros canales VOC, a parte de los de tipo L, en la activación del músculo liso vesical es menos conocida, sin embargo, se ha demostrado la implicación de canales VOC tipo T en la regulación de la contractilidad vesical, con mayor relevancia a bajos potenciales de membrana (Chow *et al.*, 2003). Así, los canales VOC tipo T, son activados a potenciales de membrana relativamente hiperpolarizados (-70 mV) inhibiéndose por la despolarización de la célula muscular lisa (Chow *et al.*, 2003).

En el cuello de la vejiga urinaria (Arteaga *et al.*, 2012b; Ribeiro *et al.*, 2014b) y uréter intravesical (Ribeiro *et al.*, 2014a), además de los canales VOC, se ha demostrado que canales de Ca^{2+} independientes de voltaje están involucrados en la contracción inducida por la activación de receptores peptidérgicos, aunque su implicación es mucho menor.

En la vejiga urinaria se han identificado canales de Ca^{2+} operados por agonista (ROC) que son activados por una gran variedad de agonistas (ACh, NA, endotelina y 5-HT) (Okamoto *et al.*, 2002). Estos canales movilizan Ca^{2+} atendiendo a un gradiente electroquímico a través de la membrana plasmática y son operativos a potenciales de membrana en reposo (-60 mV). Se ha postulado que el influjo de Ca^{2+} a través de estos canales, podría afectar a las corrientes de Cl^- y/o la activación de canales de K^+ alterando así, el potencial de membrana y la activación de canales VOC (Large, 2002; Piper & Large, 2003). Para hacer la diferencia entre los canales ROC y los canales de Ca^{2+} operados por depósito (SOC), se admite que los ROC son canales de cationes (mono y divalentes) no selectivos y que se abren por la unión de un agonista a un receptor, mientras que los canales SOC se activan mediante agentes que o bien vacían los depósitos intracelulares de Ca^{2+} o mediante inhibidores de las bombas SERCA (Putney, 2011). La presencia de canales SOC ha sido señalada en diversos tejidos, sin embargo, el mecanismo de activación de estos canales, sigue siendo objeto de discusión. En el urotelio de la vejiga humana, los canales SOC parecen modular la liberación de ATP urotelial (Matsumoto-Miyai *et al.*, 2011), y en menor medida, la contracción colinérgica de la vejiga de rata (Schneider *et al.*, 2004b) y del hombre (Schneider *et al.*, 2004a).

Canales de K^+

Los canales de K^+ desempeñan un papel fundamental en la regulación del tono de la pared vesical, regulando y ajustando el influjo de Ca^{2+} extracelular vía canales VOC tipo L y también, las concentraciones citosolicas de Ca^{2+} . Estos canales se expresan en la membrana del músculo liso, formando un poro permeable a K^+ (Brading & Brain, 2011;

Petkov, 2012). En la vejiga urinaria se expresan varios tipos de canales de K^+ incluyendo los canales de K^+ dependientes de ATP (K_{ATP}), canales de K^+ activados por Ca^{2+} (K_{Ca}), canales de K^+ operados por voltaje (K_V) y los canales de potasio de doble poro (K_{2P}) (Petkov, 2012) (Figura V).

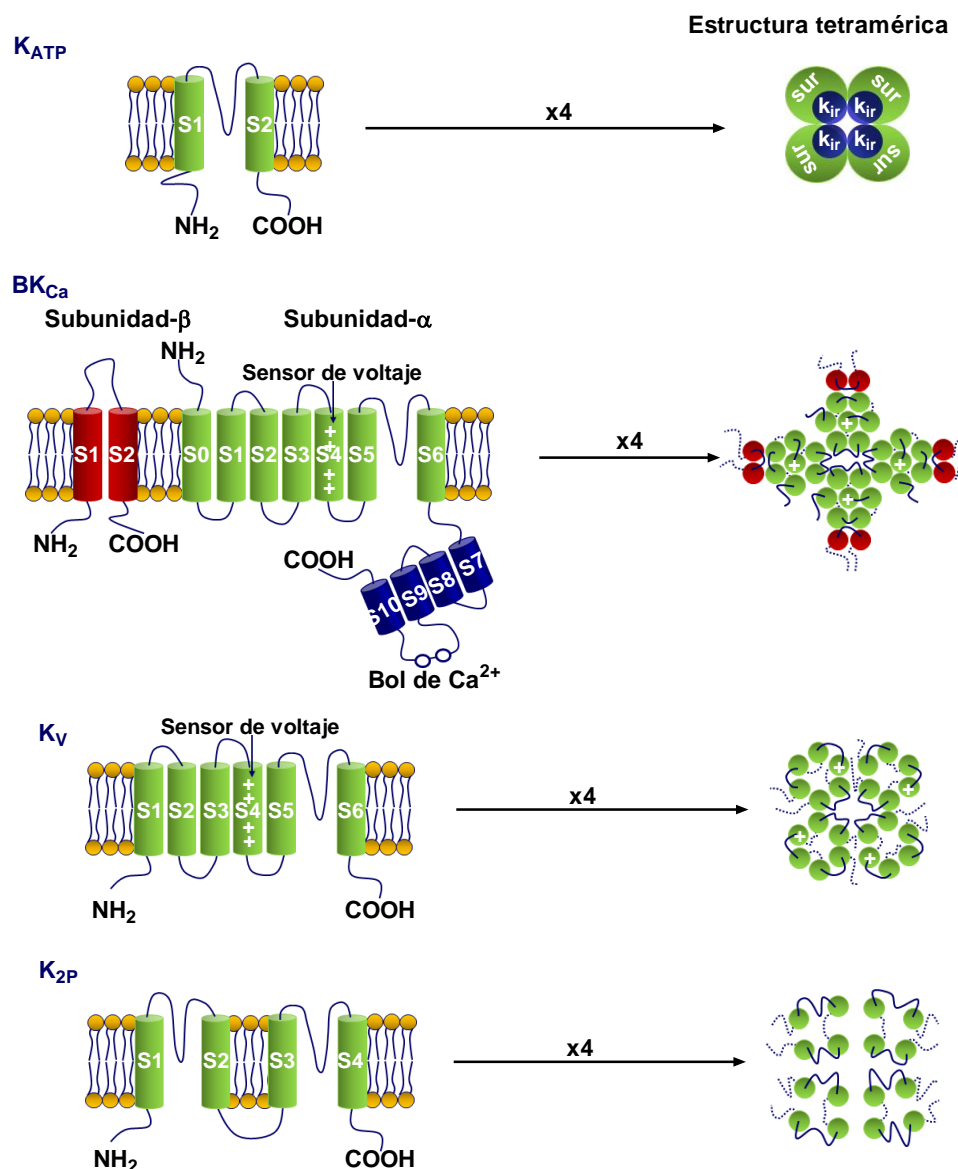


Figura V. Representación esquemática de la arquitectura de los canales de K^+ . Los canales K_{ATP} , presentan dos segmentos transmembrana denominados S1 y S2, los cuales, están constituidos por cuatro subunidades que forman un poro tetramérico funcional. Los canales BK_{Ca} presentan una subunidad β reguladora y una subunidad α sensible al voltaje (sensor localizado en S4) y al Ca^{2+} (bol intracelular localizado entre S9-S10). Está formado por cuatro subunidades β y α formando un poro tetramérico funcional. Los canales K_V presentan seis segmentos transmembrana con un sensor de voltaje en el dominio S4 y está formado por cuatro subunidades que forman un poro tetramérico funcional entre los dominios S5-S6. Los canales K_{2P} presentan cuatro segmentos transmembrana y forman una estructura tetramérica funcional constituida por dos poros, entre S1-S2 y S3-S4.

La activación de los canales K^+ hiperpolariza la membrana de la célula muscular lisa, limitando la entrada de Ca^{2+} a través de los canales VOC tipo L y produciendo la relajación del músculo liso. Por otro lado, la inhibición de estos canales despolariza la membrana muscular lisa lo que activa los canales VOC tipo L causando contracción (Hashitani *et al.*, 2004; Brading, 2006). Así, los canales de K^+ participan en la regulación de la contractilidad del músculo liso de la vejiga urinaria, manteniendo el potencial de membrana de reposo así como la conformación de los potenciales de acción que determinan la contracción de naturaleza miogénica (Petkov, 2012).

La vejiga urinaria expresa canales K_{ATP} (también conocidos por canales K_{ir6}) que contribuyen a la regulación de la contractilidad vesical (Andersson & Arner, 2004; Petkov, 2012). Dichos canales están integrados por cuatro subunidades rectificadoras de corrientes de entrada ($K_{ir6.x}$), que se organizan formando el poro del canal y se unen a cuatro subunidades reguladoras integradas por receptores de sulfonilurea que unen ATP (Kajioka *et al.*, 2008). Los canales K_{ATP} son regulados por las concentraciones de ATP intracelular y por sulfonilureas. De hecho, cuando la concentración de ATP intracelular es baja y la concentración de ADP es alta, el canal se activa, hiperpolarizando la membrana celular. La dependencia del ATP en la regulación del canal K_{ATP} vincula el estado metabólico celular con la regulación de la excitabilidad de la membrana muscular lisa (Brading & Brain, 2011; Petkov, 2012). La activación de canales K_{ATP} disminuye la frecuencia de contracción (Weiss *et al.*, 2002) y participan en la relajación de la musculatura lisa del uréter (Hernández *et al.*, 1997) y del cuello vesical (Fernandes *et al.*, 2014b). Asimismo, su activación causa hiperpolarización de la membrana celular del detrusor, produciendo el cierre de los canales VOC tipo L originando una disminución de la contractilidad del detrusor (Petkov *et al.*, 2001). A pesar del papel de los canales K_{ATP} en la regulación de la excitabilidad y contractilidad de la musculatura lisa vesical, no existen evidencias que alteraciones de la expresión de estos canales, estén involucrados en la fisiopatología del Tracto Urinario. En modelos de ratones que carecen de diferentes subunidades de los canales K_{ATP} , no se han observado diferencias en la contractilidad del detrusor cuando comparado con la contractilidad del detrusor de ratones con canales K_{ATP} íntegros (Petkov, 2012).

Los canales K_{Ca} son abundantes en el músculo liso de la pared vesical produciendo la hiperpolarización de la membrana que sigue al potencial de acción y permitiendo la adaptación de la membrana a la frecuencia de disparo de los potenciales de acción (Brading & Brain, 2011; Petkov, 2012), siendo los BK_{Ca} los que desempeñan un papel más

relevante en la regulación del tono de la pared vesical. De hecho, estos canales contribuyen a mantener el potencial de membrana en reposo y modulan la fase de repolarización de los potenciales de acción y el influjo de Ca^{2+} extracelular a través de los canales VOC tipo L (Petkov, 2012).

Los canales BK_{Ca} están formados por una subunidad α , que da estructura al poro del canal y donde se encuentra el sensor de Ca^{2+} , y por una subunidad β , que modula la actividad del canal, pudiendo inactivarlo o disminuyendo su tiempo de activación (Brading & Brain, 2011). La subunidad β_1 es específica del músculo liso y su bloqueo disminuye la actividad del canal incrementando la contractilidad de la pared vesical (Petkov, 2012). El Ca^{2+} desempeña un papel importante en la regulación del canal BK_{Ca} . En el detrusor, la activación del canal BK_{Ca} depende tanto de la entrada de Ca^{2+} a través del canal VOC tipo L como de la liberación de Ca^{2+} del RS vía receptores de rianodina (Herrera *et al.*, 2001). La liberación de Ca^{2+} del RS en forma de “ Ca^{2+} sparks” a través de los receptores de rianodina, activan el canal BK_{Ca} hiperpolarizando la membrana celular e inhibiendo el influjo de Ca^{2+} extracelular que conduce a la relajación del detrusor (Herrera *et al.*, 2001). En el uréter, la activación de los canales BK_{Ca} como consecuencia del incremento de las “ Ca^{2+} sparks” determina el periodo refractario de los potenciales de acción (Burdyga & Wray, 2005; Borisova *et al.*, 2007). Dichos canales están también involucrados en la relajación del músculo liso del cuello vesical (Arteaga *et al.*, 2012a; Fernandes *et al.*, 2014b; Ribeiro *et al.*, 2014b; Ribeiro *et al.*, 2014c). Alteraciones en la expresión y la función de los canales BK_{Ca} tiene implicaciones en la contractilidad de la musculatura lisa. Así, la expresión y actividad de los canales BK_{Ca} está disminuida en vejigas hiperactivas tanto neurogénicas (Oger *et al.*, 2011) como secundario a la obstrucción parcial del cuello de la vejiga y uretra proximal (Aydin *et al.*, 2012).

El papel de los canales SK_{Ca} y IK_{Ca} es menos conocido que los BK_{Ca} (Brading & Brain, 2011). Estos canales presentan una gran sensibilidad al Ca^{2+} , por lo que funcionan como sensores para los cambios del Ca^{2+} citosólico inducidos por la activación de los canales VOC tipo L durante la fase de despolarización. La sensibilidad de los canales SK_{Ca} y IK_{Ca} al Ca^{2+} es regulada por la calmodulina la cual se une previamente a la cola C citoplasmática del canal (Brading & Brain, 2011; Petkov, 2012). Los canales SK_{Ca} están involucrados en el incremento de la permeabilidad al K^+ y en la repolarización del potencial de membrana en la fase de post-hiperpolarización lenta (Petkov, 2012). En el detrusor, la inhibición farmacológica de los canales SK_{Ca} incrementa tanto la actividad miogénica como neurogénica (Afeli *et al.*, 2012), mientras que la activación farmacológica

de los canales SK_{Ca} e IK_{Ca} aumenta la capacidad de distensión de la pared de la vejiga y disminuye la frecuencia miccional (Petkov, 2012). En el cuello de la vejiga urinaria, la activación de dichos canales está involucrada en la relajación del músculo liso mediada a través de la activación de receptores de endotelina ET_B (Arteaga *et al.*, 2012a) y de inhibidores de fosfodiesterasas 4 (Ribeiro *et al.*, 2014c), respectivamente. En el uréter, la inhibición de los canales IK_{Ca} disminuye la conductancia del potencial de membrana y prolonga la fase de meseta del potencial de acción, lo que demuestra su papel en el mantenimiento del potencial de membrana en reposo y en la repolarización del potencial de acción (Sui & Kao, 1997).

De todos los canales de K^+ , los canales K_V constituyen el grupo más numeroso y los que presentan mayor variabilidad en sus mecanismos de activación e inactivación (Petkov, 2012). Se han descrito doce tipos de canales K_V (K_{V1} - K_{V2}) que se agrupan en cuatro familias en función de la homología entre sus secuencias de aminoácidos: K_{V1} - K_{V6} , K_{V8} - K_{V9} , K_{V7} , K_{V10} - K_{V12} . Las propiedades de estos canales dependen de la combinación de subunidades que lo formen, pudiendo formar homotetrámeros, cuando constituidos por cuatro subunidades idénticas (K_{V1} - K_{V4} , K_{V7} y K_{V10} - K_{V12}), o bien, heterotetrámeros, cuando formados por cuatro subunidades distintas (K_{V5} , K_{V6} , K_{V8} y K_{V9} forman heterometrimeros con la subunidad K_{V2}) (Gutman *et al.*, 2003). Los canales K_V incluyen a los llamados canales de K^+ rectificadores tardíos, que desempeñan un importante papel fisiológico en la repolarización del potencial de membrana tras la fase de despolarización del potencial de acción. Estos canales son activados por la despolarización de la membrana en un rango de voltaje cercano al potencial de reposo, generando corrientes de K^+ independientes de Ca^{2+} (Thorneloe & Nelson, 2003). El detrusor humano expresa receptores $K_{V2.1}$ y $K_{V2.2}$ que controlan la excitabilidad de la musculatura lisa. Así, el bloqueo de los canales K_{V2} incrementa las contracciones miogénicas y neurogénicas del musculo detrusor (Hristov *et al.*, 2012). En el cuello de la vejiga canales K_V presinápticos modulan la neurotransmisión inhibitoria no adrenérgica, no colinérgica (Hernández *et al.*, 2008; Recio *et al.*, 2009; Fernandes *et al.*, 2012; Ribeiro *et al.*, 2014c). Asimismo, canales K_V postsinápticos están involucrados en la relajación del cuello vesical inducida por el PACAP 38 y el VIP (Hernández *et al.*, 2006b).

De los canales K_{2P} sensibles al pH, se han identificado los subtipos TASK-1 y TASK-2 en el detrusor del ratón. Estos canales tienen un papel importante en la estabilización del potencial de membrana de reposo de la célula muscular lisa y en la reducción de la excitabilidad y contractilidad del detrusor en respuesta al estiramiento

durante el llenado de la vejiga (Petkov, 2012). La administración sistémica de l-metionina, un inhibidor del subtipo TREK-1, induce contracciones espontáneas durante el llenado de la vejiga. En un modelo de ratón con obstrucción parcial de la uretra, la actividad del canal TREK-1 está disminuida produciendo, en última instancia, la hiperactividad del detrusor (Baker *et al.*, 2010).

Canales de potencial de receptor transitorio

Los canales TRP son una superfamilia de canales catiónicos que participan en procesos fisiológicos en respuesta a una amplia variedad de estímulos físicos y/o químicos. Los canales TRPV1, TRPV2 y TRPV4, de la subfamilia de los vaniloides, han sido identificados en el Tracto Urinario y no se restringen únicamente a las aferentes primarias (Avelino *et al.*, 2013). Más recientemente se ha descrito la presencia y función de canales TRP pertenecientes a la subfamilia anquirina (TRPA1) y melastatina (TRPM8) distribuidos en la vejiga (Avelino *et al.*, 2013). Los canales TRP son estructuralmente similares. Cada subunidad está constituida por seis segmentos transmembrana, forman un poro tetramérico funcional entre S5-S6 y poseen un dominio intracelular NH₂ y COOH (Avelino *et al.*, 2013) (Figura VI).

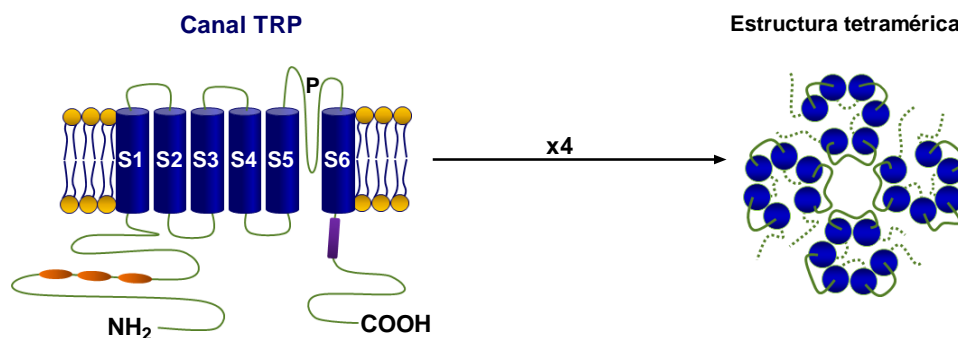


Figura VI. Estructura general de un canal TRP. Cada subunidad de un canal TRP presenta seis segmentos transmembrana. Cuatro subunidades forman un poro tetramérico funcional entre los dominios S5-S6.

El papel del canal TRPV1 es el más estudiado en la Fisiología del Tracto Urinario. La activación de los canales TRPV1 en aferentes primarias sensibles a capsaicina (APSC) produce la liberación de taquicininas, como la sustancia P (SP), que activan receptores NK₁ y NK₂ conduciendo a la contracción del detrusor (Patacchini *et al.*, 2005). Asimismo,

la estimulación de estos canales, localizados en el urotelio, con capsaicina promueve la liberación de ATP (Charrua *et al.*, 2009; Avelino *et al.*, 2013). Esta liberación ocurre durante la fase de llenado vesical por lo que se ha sugerido que la activación de los receptores P2X de las fibras nerviosas suburoteliales contribuye a la sensación de plenitud del llenado vesical (Birder & Andersson, 2013). En los cuadros de cistitis, se ha descrito un incremento de la actividad purinérgica debido al aumento de las concentraciones de ATP. Esta observación está en consonancia con la sobreexpresión de los canales TRPV1 uroteliales, sugiriendo así, que dichos canales participan en la liberación de ATP (Avelino *et al.*, 2013).

El TRPV4 es un canal catiónico no selectivo que se expresa principalmente en el urotelio y que participa en la liberación de ATP en respuesta a estímulos físicos como la distensión de la pared vesical (Birder & Andersson, 2013). La activación de canales TRPV4 incrementa la contractilidad del detrusor. Aunque su papel en la función de la vejiga no es del todo conocido, ratones que no expresan canales TRPV4 presentan una respuesta miccional disminuida. La instilación intravesical de un agonista TRPV4 en vejigas de rata, desencadena un nuevo reflejo miccional que podría regular la fase tardía de la micción (Avelino *et al.*, 2013; Birder & Andersson, 2013). Otros estudios sugieren que la activación de canales uroteliales TRPV4 facilita el reflejo vesical vía activación de fibras C resistentes a la capsaicina. Además, están involucrados en el reflejo uretrovesical facilitando el vaciamiento de la vejiga (Birder & Andersson, 2013).

Los canales TRPA1 se expresan junto con los canales TRPV1 en las APSC y en el urotelio. Esto sugiere que pueden estar funcionalmente vinculados (Avelino *et al.*, 2013). De hecho, en ratones genéticamente modificados para no expresar el canal TRPV1, la respuesta inducida por la activación de los canales TRPA1 se encuentra significativamente disminuida. Asimismo, la ausencia de canales TRPA1 reduce la actividad funcional de los TRPV1. En la vejiga de la rata, los agonistas TRPA1 originan la hiperreflexia vesical por mecanismos dependientes de la activación de las APSC. La disminución de la actividad de estos canales reduce la hiperactividad del detrusor característica de los lesionados medulares (Avelino *et al.*, 2013).

Tanto las células uroteliales como las APSC presentan inmunoreactividad positiva para el canal TRPM8. El mentol, un activador del TRPM8 reduce el umbral del volumen de llenado e incrementa la presión intravesical de la vejiga, facilitando así, el reflejo miccional. El incremento en la expresión y la densidad de los canales TRPM8 está relacionado con la hiperactividad idiopática del detrusor (Avelino *et al.*, 2013).

El canal TRMP4 ha sido recientemente identificado en el músculo detrusor (Parajuli *et al.*, 2013). De hecho, la activación de estos canales incrementa la excitabilidad y contractilidad de la pared vesical y reduce la excitabilidad de la célula muscular lisa. Los niveles de RNAm del canal TRPM4 son mucho mayores en el detrusor que los encontrados en la célula muscular lisa vascular (Parajuli *et al.*, 2013).

1.3.3. Actividad miogenica

La célula muscular lisa tiene la capacidad de generar contracciones independientes de la estimulación externa, siendo esta una de las características más importantes de la musculatura lisa del Tracto Urinario (Andersson & Arner, 2004). Las células musculares del detrusor (Wang *et al.*, 2001), trigono (John *et al.*, 2001) y uréter (Lang *et al.*, 2007) están acopladas eléctricamente a través de *uniones en hendidura* o *gap* que favorecen la propagación de potenciales de acción entre células adyacentes (John *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2001). La comunicación intercelular mediante la *uniones gap*, favorece el inicio y el mantenimiento de la contracción de la musculatura lisa (John *et al.*, 2001). Dichas comunicaciones junto con el SNA y los mecanismos de transducción miogénica forman la denominada “*triada de tejido sincitial*” responsable, en gran medida, de la regulación del tono de la pared vesical (Karicheti & Christ, 2001).

La actividad espontánea de la pared celular del músculo liso del sistema pieloureteral se inicia en las células musculares lisas *atípicas*. La liberación de Ca^{2+} del RS por mecanismos dependientes del inositol trifosfato (InsP_3), genera potenciales de acción despolarizantes transitorios (Lang *et al.*, 2010). Esta señal, facilitada por la presencia de *uniones gap*, se propaga a células musculares lisas adyacentes desencadenando potenciales de acción espontáneos y implicando el flujo de Ca^{2+} extracelular a través de canales VOC tipo L (Lang *et al.*, 2007; Lang *et al.*, 2010). Además, los canales K_{Ca} y K_{V} están involucrados en la modulación de las contracciones espontáneas ureterales (Lang *et al.*, 2006).

En el detrusor la amplitud de las contracciones espontáneas es dependiente tanto de la entrada de Ca^{2+} extracelular a través de canales VOC tipo L como de la liberación de Ca^{2+} desde el RS. Asimismo, la vía de la Rho-cinasa (Wibberley *et al.*, 2003) y canales de K^+ de membrana juegan un importante papel en las contracciones espontáneas miogénicas (Andersson & Arner, 2004). De hecho, la inhibición de los canales BK_{Ca} , SK_{Ca}

y K_v incrementa la amplitud y la frecuencia de las contracciones espontáneas, poniendo de manifiesto la importancia de estos mecanismos en la regulación de la actividad fásica espontánea (Buckner *et al.*, 2002; Petkov, 2012). La inhibición de los canales K_{ATP} , no altera las contracciones miogénicas, sin embargo, su activación suprime la actividad miogénica espontánea (Buckner *et al.*, 2002; Petkov, 2012). Además de estos mecanismos, las contracciones fásicas espontáneas del detrusor también son moduladas por el urotelio (Buckner *et al.*, 2002).

En el trigono, la presencia de *uniones gap* garantiza la propagación de la señal eléctrica y la contracción espontánea sostenida de toda la base de la vejiga cuya actividad depende esencialmente del influjo de Ca^{2+} extracelular a través de los canales VOC tipo L del plasmolema (John *et al.*, 2001; Roosen *et al.*, 2009). El bloqueo de los canales BK_{Ca} y SK_{Ca} no altera las contracciones espontáneas, sin embargo, la inhibición farmacológica de los canales Cl^- , disminuyen tanto las señales de Ca^{2+} transitorias como la actividad miogénica espontánea (Roosen *et al.*, 2009).

La obstrucción del Tracto Urinario Inferior que impide el flujo de salida normal de orina está relacionado con la hiperactividad del detrusor (Andersson & Arner, 2004). En consecuencia de la obstrucción, se producen cambios morfológicos de la pared de la vejiga urinaria y de las propiedades eléctricas. Dichos cambios son consistentes con la reducción de los potenciales de acción espontáneos de la membrana de la célula muscular lisa. Asimismo, las contracciones espontáneas se encuentran incrementadas en situaciones, en las cuales, la actividad aferente está exacerbada, contribuyendo a la hiperactividad del detrusor (Andersson & Arner, 2004).

1.4. REGULACIÓN COLINÉRGICA Y ADRENÉRGICA

Mecanismos colinérgicos

La liberación de ACh desde las terminaciones nerviosas parasimpáticas activa receptores muscarínicos de las células musculares lisas del uréter y de la vejiga urinaria (Andersson & Wein, 2004). Los receptores muscarínicos están codificados por cinco genes distintos, que corresponden a cinco subtipos caracterizados farmacológicamente (M_1 , M_2 , M_3 , M_4 , y M_5). Los receptores muscarínicos pertenecen a la familia de los receptores acoplados a la proteína G. Así, los receptores muscarínicos de subíndice par

(M₂ y M₄) se encuentran acoplados a la subunidad inhibidora de la proteína G (G_{i/o}) mientras que los receptores de subíndice impar (M₁, M₃ y M₅) están preferencialmente acoplados a la subunidad G_{q/11}. Así, la activación de receptores M₁, M₃ y M₅, incrementa las concentraciones de Ca²⁺ intracelular vía mecanismos dependientes del InsP₃/InsP₃R, y 1,2-diacilglicerol (DAG), mientras que la activación de receptores M₂ y M₄ están acoplados negativamente a la adenilato ciclasa (AC) (Andersson, 2011).

En el uréter intravesical del cerdo (Hernández *et al.*, 1993; Prieto *et al.*, 1993; Prieto *et al.*, 1994) y del hombre (Sakamoto *et al.*, 2006), se ha descrito una rica densidad de fibras colinérgicas y de receptores M₁-M₄ funcionalmente activos. En el uréter del perro, el carbacol disminuye las contracciones espontáneas ureterales a través de la activación de los receptores muscarínicos M₄ (Tomiyama *et al.*, 2003b).

En el detrusor humano se ha descrito la presencia de RNAm para todos los subtipos de receptores muscarínicos existiendo una predominancia en la expresión de los receptores M₂ y M₃ (Mansfield *et al.*, 2005). En dicha estructura, la contracción colinérgica produce una ligera despolarización incrementando la frecuencia de los potenciales de acción. Dicha respuesta es mediada vía receptores M₃ e involucra mecanismos dependientes de la liberación de Ca²⁺ del RS vía InsP₃/InsP₃R (Andersson, 2011). Asimismo, la contracción colinérgica en el detrusor del conejo es parcialmente inhibida en presencia de inhibidores de la Rho-cinasa (probablemente RhoK I y RhoK II) y canales catiónicos no selectivos (Jezior *et al.*, 2001; Wibberley *et al.*, 2003; Andersson, 2011). La activación de receptores M₃ incrementa el influjo Ca²⁺ extracelular al citosol a través de canales VOC tipo L y la sensibilidad al Ca²⁺ de la maquinaria contráctil a través de la activación de Rho-cinasas (Andersson, 2011).

El mecanismo de la contracción mediada a través de receptores M₂ parece estar relacionada con la inhibición de la relajación simpática producida por la activación de receptores adrenérgicos β, a través del bloqueo de la AC (Hegde, 2006). Asimismo, la activación de receptores M₂ modula la relajación inducida por el ATP y purinas relacionadas (Giglio *et al.*, 2001), activa canales catiónicos no específicos e inhibe la relajación inducida por la activación de los canales K_{ATP} (Bonev & Nelson, 1993). En la vejiga humana, aunque la expresión de receptores muscarínicos M₂ es más abundante que la de los M₃, el receptor funcionalmente activo es el receptor M₃ (Chapple *et al.*, 2002). Esto sugiere que los receptores M₂ y M₃ podrían funcionar de forma sinérgica para inducir la contracción del detrusor. De hecho, el carbacol induce “Ca²⁺ sparks”, que activan los canales BK_{Ca}, los cuales, son inhibidos por la activación de receptores

muscarínicos M_2 (Nakamura *et al.*, 2002) y M_3 (Parajuli & Petkov, 2013). Esto explicaría que la vía de señalización intracelular acoplada a la activación del receptor M_2 incrementa la contracción colinérgica mediada por receptores M_3 . Así, los receptores muscarínicos M_3 son los principales responsables de la contracción de la vejiga sana (Chess-Williams, 2002) y obstruida (Krichevsky *et al.*, 1999), mientras que los receptores muscarínicos M_2 , median contracciones moderadas, y su funcionalidad se incrementa cuando la contracción muscarínica M_3 está disminuida, como sucede en la denervación y en la hipertrofia de la vejiga (Braverman *et al.*, 2006).

Los receptores muscarínicos también se expresan en la membrana de las terminaciones nerviosas, sugiriendo así su participación en la regulación de la liberación de neurotransmisores (Andersson, 2011). Así, se han identificado receptores muscarínicos presinápticos M_4 inhibidores y M_1 facilitadores de la liberación de ACh en las terminaciones nerviosas de la vejiga del ratón (Andersson, 2011).

Receptores adrenérgicos α

La vejiga urinaria presenta una rica expresión de fibras nerviosas adrenérgicas, que liberan NA, regulando la actividad contráctil vía activación receptores adrenérgicos α y β (Michel, 2011; Yamada & Ito, 2011).

Los receptores adrenérgicos α_1 median sus funciones biológicas a través de la proteína $G_{q/11}$ que incrementa la actividad de la PLC y la generación de los segundos mensajeros $InsP_3$ y DAG (Hawrylyshyn *et al.*, 2004). En la vejiga urinaria se han identificado los tres subtipos de receptores α_1 (α_{1A} , α_{1D} y α_{1H}) (Sigala *et al.*, 2005).

En el uréter intravesical del cerdo, la NA estimula la actividad fásica peristáltica vía activación de receptores α_1 (Hernández *et al.*, 1992). De hecho los agonistas adrenérgicos α_1 facilitan la progresión espontánea de cálculos ureterales a través del uréter, reduciendo así, su tiempo de expulsión (Hollingsworth *et al.*, 2006). Los receptores adrenérgicos α_{1A} son los que predominantemente participan en la contracción adrenérgica ureteral (Yamada & Ito, 2011).

En el detrusor de la mayoría de las especies, agonistas de receptores adrenérgicos α_{1A} producen contracción (Andersson & Arner, 2004). Se han identificado alteraciones en la densidad y la expresión de los receptores α_1 en la hiperactividad del detrusor asociada a la obstrucción uretral y a la neuropatía. Asimismo, la administración de agonistas adrenérgicos α_1 , favorece la desaparición de la hiperactividad del detrusor, secundaria a

la obstrucción uretral causada por la hiperplasia benigna de próstata (HBP) (Andersson & Wein, 2004). Asimismo, existe una relación entre la expresión de RNAm del receptor α_{1D} en la mucosa vesical y las alteraciones urodinámicas características de pacientes con HBP (Kurizaki *et al.*, 2011).

En la zona de salida de la vejiga, los receptores α_{1A} presentan una mayor densidad de expresión y median la contracción del músculo liso vía activación de canales VOC tipo L (Testa *et al.*, 1993). La activación de receptores adrenérgicos α_2 presinápticos modulan la neurotransmisión inhibidora nitrérgica en el cuello de la vejiga urinaria (Hernández *et al.*, 2007).

Receptores adrenérgicos β

La presencia de receptores adrenérgicos β es más abundante en el detrusor, por lo que constituye uno de los principales mecanismos que favorecen la relajación del músculo liso durante la fase de llenado vesical. La estimulación de receptores adrenérgicos β activa la AC lo que incrementa las concentraciones de AMPc intracelular, activando la PKA (Andersson & Arner, 2004; Michel, 2011). La hiperpolarización producida por la activación de la ATPasa $\text{Na}^+\text{-K}^+$ de la membrana celular, participa en la relajación adrenérgica β (Nakahira *et al.*, 2001). La activación de los canales BK_{Ca} (Afeli & Petkov, 2013) y canales K_{ATP} (Hudman *et al.*, 2000) están involucrados en la relajación inducida por agonistas adrenérgicos β en la pared vesical.

La estimulación de los receptores adrenérgicos β participa, asimismo, en la modulación de la contractilidad espontánea ureteral (Hernández *et al.*, 1992). En el músculo liso del uréter humano se han identificado receptores β_2 y β_3 que median la relajación ureteral (Park *et al.*, 2000). Así, en el uréter de la rata (Tomiyama *et al.*, 2003a), del cerdo (Hernández *et al.*, 1992) y del hombre (Matsumoto *et al.*, 2013), la estimulación de receptores β_2 y β_3 produce relajación de la pared ureteral. En la patología ureteral, la estimulación adrenérgica β juega un papel importante. Así, en el uréter obstruido de conejo (Miyatake *et al.*, 2001) y perro (Murakami *et al.*, 2000), la estimulación de los receptores β_3 disminuye la presión ureteral por encima del cálculo promoviendo la relajación del músculo liso y facilitando la expulsión del mismo.

Los tres subtipos de receptores β están, asimismo, presentes en el urotelio, en las células miofibroblásticas del suburotelio, en las células ganglionares intramurales y en

las células de Schwann de nervios de la vejiga de la rata (Kullmann *et al.*, 2009), el cerdo (Masunaga *et al.*, 2010) y el hombre (Otsuka *et al.*, 2008).

En las vejigas sanas, la expresión del RNAm de los receptores adrenérgicos β_1 y β_2 es menos abundante que la del receptor β_3 . Sin embargo, en diferentes modelos animales con hiperactividad de la pared vesical, se ha descrito que la relajación inducida por los agonistas selectivos β_3 es sumamente efectiva, por lo que agonistas β_3 , como el mirabegrón, han sido propuestos como herramientas farmacológicas efectivas para el tratamiento de vejigas hiperactivas en el hombre (Michel, 2011).

1.5. REGULACIÓN NO ADRENÉRGICA NO COLINÉRGICA (NANC)

Trifosfato de adenosina (ATP)

El ATP y las purinas relacionadas, ADP y adenosina, son moléculas que participan en la regulación de la contractilidad de la musculatura lisa de la pared vesical. El ATP ejerce sus efectos biológicos activando dos familias de receptores purinérgicos: una familia de canales iónicos (receptores P2X con 7 subtipos, P2X₁ – P2X₇) y una familia de receptores asociados a la proteína G (P2Y con 8 subtipos: P2Y₁ – P2Y₁₄) (Burnstock, 2011).

Se han identificado receptores purinérgicos funcional activos en el uréter (Lee *et al.*, 2000). De hecho, en respuesta a la distensión ureteral, el ATP, vía activación de los receptores purinérgicos P2X₃ neuronales y uroteliales, median respuestas asociadas al dolor, percepción del volumen de orina y contracción de la musculatura lisa ureteral (Knight *et al.*, 2002; Rong & Burnstock, 2004; Calvert *et al.*, 2008). Asimismo, la adenosina, formada a partir de la hidrólisis del ATP, induce la relajación del uréter intravesical del cerdo vía mecanismos independiente de prostanoïdes y/o de NO, involucrando la activación de receptores A_{2B} localizados en el músculo liso (Hernández *et al.*, 1999).

El ATP se libera conjuntamente con la ACh durante la fase de activación parasimpática iniciando la contracción del músculo detrusor, mientras que la ACh continuaría y finalizaría dicha contracción produciendo, en última instancia, el vaciado completo de la vejiga urinaria. La contracción del detrusor inducida por el ATP es mediada vía receptores ionotrópicos P2X₁, cuya activación provoca una entrada rápida de Ca²⁺ al citosol (Burnstock, 2011). En la vejiga del conejo, el ATP induce una respuesta

bifásica, sin embargo, después de la desensibilización con α,β -met-ATP, agonista selectivo P2X₁, dicha respuesta se vuelve monofásica apuntando, así, a la implicación de dos subtipos de receptores purinérgicos (Burnstock, 2011). Aunque la contracción producida por el ATP en el detrusor del hombre es mediada principalmente vía activación P2X₁, también se han identificado receptores P2X₄ y P2X₇ pero su funcionalidad es sumamente limitada (O'Reilly *et al.*, 2001). En vejigas hiperactivas se ha observado una sobreexpresión de receptores purinérgicos P2X (Moore *et al.*, 2001), en particular en la expresión de los receptores P2X₁ (O'Reilly *et al.*, 2001; Harvey *et al.*, 2002). De hecho, en los primeros estadios de cuadros obstructivos, la contracción purinérgica está incrementada mientras que la colinérgica está disminuida (Calvert *et al.*, 2008). Así, la transmisión purinérgica anómala podría explicar el cuadro sintomatológico de pacientes con vejigas obstruidas e hiperactivas, reforzando así, la importancia del ATP en los desórdenes motores de la funcionalidad de la vejiga urinaria (O'Reilly *et al.*, 2001; Harvey *et al.*, 2002). En el cuello de la vejiga urinaria, el ATP está involucrado en la neurotransmisión inhibidora NANC produciendo relajación de la musculatura lisa a través de la activación de receptores purinérgicos A_{2A} y P2Y₁ (Hernández *et al.*, 2009).

Óxido nítrico (NO)

El NO es considerado el principal neurotransmisor inhibidor NANC del Tracto Urinario. Se han identificado las tres isoformas de la sintasa de NO, la neuronal (NOS_n), la inducible (NOS_i) y la endotelial (NOS_e). El NO ejerce sus efectos biológicos vía activación de la guanilato ciclasa soluble (GCs) aumentando las concentraciones y la actividad del GMPc intracelular (Andersson & Arner, 2004).

Mientras que en el uréter proximal, el NO, liberado desde el urotelio, reduce las contracciones miogénicas espontáneas ureterales (Mastrangelo *et al.*, 2003) en los segmentos más distales ureterales, el NO liberado desde las terminaciones nerviosas desempeña un papel fundamental en la neurotransmisión inhibidora NANC (Hernández *et al.*, 1995) relajando la musculatura lisa a través de un mecanismo dependiente de la GC/GMPc que favorece la apertura de los canales K_{ATP} (Hernández *et al.*, 1997).

En el detrusor, la vía del AMPc/PKA constituye el principal mecanismo involucrado en la relajación de la actividad espontánea del músculo liso, en donde la inhibición de la GMPc/PKG no afecta dicha actividad (Xin *et al.*, 2014a). Sin embargo,

donantes de NO producen la relajación del detrusor a través de la vía del GMPc/PKG y la activación de canales BK_{Ca} y mecanismos de desensibilización al Ca²⁺ (Hofmann *et al.*, 2000). Por lo tanto, aunque no parece probable que el NO actúe como neurotransmisor inhibitor en el detrusor, sin embargo, puede modular el efecto de otros neurotransmisores o desempeñar un papel significativo en la transmisión aferente, ya que cambios en la actividad de la NOSi favorece el desarrollo de la hipertrofia de la pared vesical. De hecho, en la obstrucción de la zona de salida de orina de la vejiga, la actividad de la NOSi está incrementada mientras que la actividad de la NOSn se encuentra disminuida (Felsen *et al.*, 2003). El incremento de la expresión de la NOSi, como consecuencia de patologías obstructivas, favorece la generación de contracciones espontáneas de la vejiga y produce fibrosis de la pared vesical. De hecho, se ha sugerido que los inhibidores de la NOSi constituyen una herramienta terapéutica efectiva en la hiperactividad e hipertrofia de la pared vesical (Felsen *et al.*, 2003).

En el cuello de la vejiga urinaria del hombre y del cerdo, el NO, cuya liberación es modulada por los canales K_v y receptores adrenérgicos α₂ de la membrana de la terminación nerviosa, está involucrado en la neurotransmisión inhibitor causando relajación de la musculatura lisa a través de mecanismos dependientes de la GCs (Hernández *et al.*, 2007; Hernández *et al.*, 2008; Bustamante *et al.*, 2010) por lo que el NO neuronal, liberado durante la fase de activación parasimpática, produce la relajación de la base de la vejiga facilitando el vaciado completo de la misma.

Neuropéptidos

Numerosos neuropéptidos, como el péptido intestinal vasoactivo (VIP), el polipéptido activador de la adenilato ciclasa soluble (PACAP), el péptido relacionado con el gene de la calcitonina (CGRP), la SP, las neurocininas A y B (NKA y NKB), bradicininas y endotelinas, desempeñan un importante papel en la fisiología y fisiopatología miccional (Arms & Vizzard, 2011).

Los neuropéptidos VIP y PACAP 38 se unen a receptores PAC₁ (específico para el PACAP), VPAC₁ y VPAC₂ (con similar afinidad por el VIP y el PACAP), los cuales, están acoplados a la subunidad G_s de las proteínas G. La activación de estos receptores median la respuesta fisiológica vía mecanismos dependientes de la AC/AMPc/PKA (Arms & Vizzard, 2011). El VIP y el PACAP relajan el uréter del cerdo a través de receptores musculares VPAC₂, receptores de terminaciones nerviosas motoras VPAC y

receptores PAC₁, presentes en las APSC, acoplados a la liberación de NO (Hernández *et al.*, 2004). Asimismo, el VIP y el PACAP actúan como neuropéptidos inhibidores NANC relajando el detrusor (Yoshiyama & de Groat, 2008), el cuello vesical (Hernández *et al.*, 2006a; Hernández *et al.*, 2006b), y la uretra (Yoshiyama & de Groat, 2008) de diferentes especies incluido el hombre. Además, se ha descrito un efecto contráctil inducido por el PACAP en el detrusor del ratón, el cual, puede ser debido a que dicho péptido produce acciones facilitadoras presinápticas y efectos excitadores sobre neuronas preganglionares parasimpáticas lumbosacras. De hecho, el PACAP facilita la liberación del ATP desde el urotelio, contribuyendo, así, a la hipersensibilidad y a la hiperactividad del detrusor característica de la cistitis intersticial (Yoshiyama & de Groat, 2008; Arms & Vizzard, 2011). Bajos niveles plasmáticos de VIP y/o PACAP pueden provocar la disfuncionalidad motora de la vejiga urinaria, por lo que una disminución de la expresión del VIP puede estar relacionada con algunas formas de hiperactividad vesical, como la hiperactividad idiopática o neurogénica del detrusor (Arms & Vizzard, 2011). Tanto el VIP como el PACAP 38, participan en la neurotransmisión inhibidora NANC del cuello de la vejiga urinaria del cerdo produciendo relajación a través de su acoplamiento a receptores musculares VPAC₂. Además, receptores facilitadores PAC₁, localizados en las APSC y acoplados a la liberación de NO, y receptores VPAC inhibidores, presentes en las terminaciones nerviosas motoras, están involucrados en las relajaciones inducidas por PACAP 38 y VIP, respectivamente (Hernández *et al.*, 2006a; Hernández *et al.*, 2006b).

Taquicininas como la SP, la NKA y la NKB, han sido identificadas también en las APSC de la vejiga urinaria de varias especies incluido el hombre. Se han caracterizado genómica y farmacológicamente, tres subtipos de receptores taquicinérgicos: receptores NK₁, NK₂ y NK₃, los cuales, están acoplados a proteínas G. La SP, la NKA y la NKB activan los tres subtipos de receptores taquicinérgicos, aunque con diferentes afinidades. La SP tiene afinidad para el receptor NK₁, la NKA para el receptor NK₂ y la NKB se acopla preferencialmente a los dos subtipos NK_{3A} y NK_{3B} (Lecci & Maggi, 2003). Todos los subtipos se expresan en el uréter y en la vejiga urinaria, siendo el receptor NK₂ el receptor funcionalmente activo que produce contracción del músculo liso a través del influjo de Ca²⁺ extracelular a través de canales VOC tipo L y, en menor medida, por la movilización de Ca²⁺ desde el RS (Burcher *et al.*, 2000). Las taquicininas participan en la neurotransmisión excitadora del uréter intravesical del cerdo (Bustamante *et al.*, 2000;

Bustamante *et al.*, 2001) y del hombre (Nakada *et al.*, 2001) vía activación de los receptores NK₂.

En las APSC del Tracto Urinario, las taquicininas coexisten con el CGRP, el PACAP y aminoácidos excitadores como el glutamato y el aspartato (Bustamante *et al.*, 2000; Bustamante *et al.*, 2001; Avelino & Cruz, 2006). El uréter de los mamíferos presenta una rica innervación sensorial peptidérgica. Un 91% de las fibras aferentes que recibe el uréter de cobaya son APSC (Maggi *et al.*, 1995). Dichas fibras participan en la modulación local de la motilidad ureteral a través de la liberación del CGRP, el cual, actúa como neurotransmisor inhibitorio en el uréter de la rata y de cobaya relajando el músculo liso a través de un mecanismo dependiente de la AC/AMPC e involucrando la activación de canales de K⁺ (Santicioli & Maggi, 1998). En el detrusor del hombre, aunque existen fibras sensoriales conteniendo CGRP, este parece tener una escasa repercusión funcional (Uckert *et al.*, 2002). Por otro lado, en el cuello de la vejiga urinaria del cerdo existe una rica densidad de fibras inmunorreactivas para el CGRP que penetran en la serosa y se distribuyen por la capa urotelial y muscular lisa. El CGRP juega un papel importante en la neurotransmisión inhibitoria NANC, relajando el músculo liso del cuello vesical vía activación de los receptores neuronales y musculares del CGRP a través de mecanismos independientes del NO y de las ciclooxygenasas (COXs) (Martínez-Sáenz *et al.*, 2011).

La presencia de las tres isoformas (ET₁, ET₂ y ET₃) de endotelinas en la vejiga, está ampliamente documentada en la literatura. Estas participan en la contracción de la musculatura lisa de la pared vesical vía activación de receptores de endotelinas ET_A y ET_B (Andersson & Arner, 2004). La isoforma ET₁, y en menor medida, la ET₃ producen contracciones lentas del detrusor humano vía activación de los receptores ET_A, los cuales incrementan el flujo de Ca²⁺ extracelular a través de la activación de canales VOC tipo L y de la liberación de Ca²⁺ desde el RS (Andersson & Arner, 2004). Asimismo, la ET₁ desempeña una acción moduladora en la neurotransmisión excitadora del detrusor, facilitando la liberación de ATP (Donoso *et al.*, 1994). A pesar de su papel modulador en la contractilidad del detrusor, no está establecida su posible utilidad terapéutica en los cuadros de hiperactividad vesical (Andersson, 2010). En la obstrucción del flujo de salida, existe un marcado incremento de la expresión de receptores ET_A, indicando así, un posible papel de dichos receptores en la hiperplasia e hipertrofia del detrusor asociada a la obstrucción de salida (Khan *et al.*, 1999). Los receptores de endotelina pre- y post-sinápticos participan, asimismo, en la regulación de la tensión de la musculatura

lisa del cuello vesical. Así, la endotelina produce contracción vía activación de receptores ET_A musculares dependiente del influjo de Ca²⁺ extracelular a través de canales de Ca²⁺ dependientes e independientes de voltaje (Arteaga *et al.*, 2012b). Asimismo, receptores ET_A neuronales modulan la neurotransmisión inhibitoria NANC dependiente de NO (Arteaga *et al.*, 2012b), mientras que receptores ET_B musculares, median la relajación del cuello a través de mecanismos independientes del NO y de la COX, involucrando la activación de la PKA y canales BK_{Ca} y SK_{Ca}. Asimismo, receptores ET_B participan en la modulación de la neurotransmisión inhibitoria NANC del cuello vesical (Arteaga *et al.*, 2012a).

Asimismo, se ha descrito la presencia de receptores bradicinérgicos B₁ y B₂ en la vejiga urinaria. Dichos receptores están asociados a proteínas G y su activación produce contracción del músculo liso vía mecanismos dependientes de la PKC, InsP₃ y DAG (Chopra *et al.*, 2005; Forner *et al.*, 2012). Receptores B₂ musculares y uroteliales median la contracción del detrusor (Chopra *et al.*, 2005; Forner *et al.*, 2012). Asimismo, la activación de receptores B₂ en vejigas hiperactivas de ratas con lesión medular favorecen la liberación de ATP y de otros mediadores de las APSC incrementando la contractilidad de la pared vesical, lo que favorece el desarrollo de procesos inflamatorios y de cambios en el tensión de la pared vesical (Chopra *et al.*, 2005; Forner *et al.*, 2012). La expresión de los receptores B₁ suele ser de naturaleza inducible y su presencia se encuentra incrementada en cuadros patológicos como la cistitis. La estimulación del receptor B₁ induce la liberación de mediadores que, a su vez, actúan sobre las APSC causando dolor e hipercontractilidad detrusoriana a través de las vías de las COXs. Dicho efecto contráctil involucra la entrada de Ca²⁺ y la activación de la Rho-cinasa y es independiente de la PLC (Sand & Michel, 2014).

Recientemente, se ha desvelado que la BK produce contracción del uréter intravesical y del cuello de la vejiga del cerdo a través de receptores B₂, localizados en el músculo liso, acoplados esencialmente al influjo de Ca²⁺ extracelular vía canales VOC tipo L. Asimismo, se ha demostrado la presencia de receptores B₂ neuronales facilitadores de la neurotransmisión inhibitoria NANC dependiente e independiente del NO (Ribeiro *et al.*, 2014a; Ribeiro *et al.*, 2014b). En el cuello vesical, receptores B₁ uroteliales promueven la relajación del músculo liso a través de mecanismos dependientes de la vía de la COX y de la activación de canales BK_{Ca} (Ribeiro *et al.*, 2014b).

Fosfodiesterasas (PDEs)

En la vejiga urinaria del hombre están presentes seis tipos de fosfodiesterasas (PDE), PDE1 - PDE5 y PDE9, mientras que en el uréter humano solo se expresan las PDE1, PDE2, PDE4 y PDE5 (Wheeler *et al.*, 2005; Uckert *et al.*, 2009). Las PDEs favorecen la hidrólisis de AMPc y GMPc regulando sus concentraciones intracelulares. El uso de inhibidores de las PDEs, incrementa la formación de AMPc y/o GMPc, evitando su metabolización, y favoreciendo así, la relajación de la musculatura lisa (Uckert *et al.*, 2009). Por ello, y teniendo en cuenta su alta densidad en el Tracto Urinario, se postula que los inhibidores de la PDEs, podrían representar una potente herramienta farmacológica en el tratamiento de hiperactividad de la pared vesical (Andersson, 2007).

En el uréter intravesical del cerdo (Hernández *et al.*, 2004) y del hombre (Kühn *et al.*, 2000), el inhibidor de la PDE4, rolipram y el activador la AC, forskolina, producen una potente relajación de la musculatura lisa, lo que sugiere que inhibidores selectivos de la PDE4 podrían ser de utilidad terapéutica en cuadros obstructivos ureterales.

En el detrusor de la cobaya, inhibidores de la PDE4, como el rolipram y el Ro-20-1724, disminuyen la contracción miogénica espontánea vía mecanismos dependientes de la AMPc/PKA e involucrando la movilización de Ca^{2+} del RS que activa canales BK_{Ca} produciendo hiperpolarización de la membrana del miocito y relajación (Xin *et al.*, 2014b).

En el cuello vesical del cerdo y del hombre, se ha demostrado una rica densidad de fibras inmunoreactivas para PDE4, en donde, el inhibidor selectivo de la PDE4, rolipram, produce una relajación de mayor magnitud que la originada por los inhibidores de la PDE5, sildenafil y vardenafil. En el cerdo, la relajación inducida por el rolipram es mediada por la vía del AMPc/PKA e involucra la activación de canales BK_{Ca} e IK_{Ca} y mecanismos dependientes de la desensibilización al Ca^{2+} . Asimismo, la inhibición de la PDE4, facilita la neurotransmisión inhibitoria NANC dependiente de NO y H_2S (Ribeiro *et al.*, 2014c).

Prostanoides

Las isoformas de la COX, COX-1 y COX-2, han sido identificadas en diferentes tipos celulares del Tracto Urinario. La síntesis de los prostanoïdes (prostaglandinas, prostaciclina y tromboxanos) es producida localmente, en el detrusor y en la mucosa,

en respuesta a estímulos fisiológicos como el estiramiento de la pared de la vejiga urinaria. Asimismo, lesiones de la mucosa vesical y mediadores de la inflamación favorecen la síntesis y liberación de prostaglandinas (Andersson & Arner, 2004).

Los prostanoides desempeñan un papel relevante en la contractilidad ureteral. La PGE₂ incrementa la contractilidad miogénica ureteral en cerdos con uréteres obstruidos y sin embargo, promueve la relajación del uréter no obstruido (Lowry *et al.*, 2005). Fármacos anti-inflamatorios no esteroideos, como el diclofenaco (inhibidor no selectivo de la COX) y el NS 398 (inhibidor selectivo de la COX-2) reducen las contracciones ureterales por lo que son indicados en cuadros obstructivos ureterales agudos relacionados con el cólico renal (Mastrangelo *et al.*, 2000). Además, mientras que la PGF_{2α} produce contracción, las PGE₁ y PGE₂ producen relajación del uréter de varias especies incluido el hombre. En el detrusor humano, dichas prostaglandinas producen contracción por acción directa sobre el músculo liso o indirecta a través de la modulación de la neurotransmisión inhibitoria (Andersson & Arner, 2004). En la vejiga de cobaya, los prostanoides son capaces de facilitar el acoplamiento excitación/contracción por movilización de Ca²⁺ de los depósitos intracelulares. Ya que la contracción del detrusor inducida por prostanoides se caracteriza por ser de presentación lenta, no parece probable una implicación directa de las prostaglandinas en el vaciado de la vejiga sino que más bien podrían funcionar como moduladores de la neurotransmisión aferente y eferente vesical (Andersson & Arner, 2004). De hecho, durante la fase de llenado, la vejiga muestra contracciones y relajaciones locales producidas por una actividad mecánica miogénica que puede estar incrementada debido a la liberación local de prostaglandinas. Dichas contracciones espontáneas son capaces de incrementar la actividad de APSC que pueden contribuir a la hiperactividad del detrusor (Andersson & Arner, 2004). La administración de inhibidores de la COX disminuyen la frecuencia miccional en modelos animales con cistitis, sin embargo, su papel en dicha disfuncionalidad está aún por determinar. Ya que prostanoides derivados de la COX están involucrados en la contracción neurogénica de la musculatura lisa de la vejiga urinaria, inhibidores de dichas enzimas son eficaces en el tratamiento de vejigas hiperactivas ya que mejoran ostensiblemente el cuadro irritativo y la alteración de los parámetros urodinámicos característicos (Andersson, 2010). Sin embargo, la elevada incidencia de efectos secundarios cuestiona su utilización terapéutica.

1.6. CÉLULAS INTERSTICIALES

En el Tracto Urinario se han identificado *Células Intersticiales de Cajal (CICs)*, que actúan como marcapasos generadores de las señales eléctricas responsables de la contractilidad espontánea del miocito y de la modulación de la neurotransmisión sensorial y motora (Drumm *et al.*, 2014; Kanai *et al.*, 2014; Kolęda & Pilecki, 2014).

Las *CICs* poseen características propias que las diferencian de las células musculares lisas. Así, presentan filamentos intermedios, vimentina y expresan el receptor de tirosina cinasa, *c-Kit* (McCloskey, 2011; Kanai *et al.*, 2014; Kolęda & Pilecki, 2014). En general, las *CICs* presentan elongaciones con varias ramificaciones laterales que se extienden a otras *CICs* y células vecinas como musculares lisas y neuronas formando una red compleja (McCloskey, 2011; Kanai *et al.*, 2014; Kolęda & Pilecki, 2014). Dicha red está acoplada eléctricamente a través de *uniones gap* que favorecen la propagación de los potenciales de acción y el desarrollo de contracciones espontáneas de las células musculares lisas (McCloskey, 2011; Kanai *et al.*, 2014; Kolęda & Pilecki, 2014).

Recientemente se han identificado una nueva clase de *CICs* en la vejiga urinaria. Dichas células expresan el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas del subtipo α (PDGFR α) mientras que el receptor *c-kit* no es expresado (Koh *et al.*, 2012; Monaghan *et al.*, 2012). Las *CICs-PDGFR α ⁺* presentan características morfológicas y funcionales similares a las *CICs-LP* lo que sugiere que también desempeñan la función de células intermediarias involucradas en la neuromodulación o en la señalización de respuestas paracrinas o hormonales (Koh *et al.*, 2012; Monaghan *et al.*, 2012; Drumm *et al.*, 2014).

Las *CICs* tienen algunas características semejantes a las células musculares lisas. Así, las *CICs-LP* expresan receptores muscarínicos M₂ y M₃, receptores purinérgicos P2X₃, P2Y₂, P2Y₄ y mayoritariamente P2Y₆ y canales catiónicos TRPV1 (McCloskey, 2011; Kanai *et al.*, 2014). En presencia de ATP, las *CICs-LP* generan corrientes de entrada transitorias que están relacionadas con las corrientes de Cl⁻ dependientes de Ca²⁺. La estimulación purinérgica sugiere que las *CICs-LP* podrían estar involucradas en la transmisión de señales desde el urotelio al detrusor. De la misma manera, las *CICs-IM* son más sensibles a neurotransmisores que median la contractilidad del detrusor como la ACh, debido a su proximidad con terminaciones nerviosas colinérgicas (Kanai *et al.*, 2014). En dichas células, los mecanismos de señalización colinérgicos son mediados a través de receptores M₃ receptores de InsP₃ y de rianodina del RS (McCloskey, 2011),

que generan tanto señales de Ca^{2+} transitorias como en forma de ondas (McCloskey, 2011; Drumm *et al.*, 2014). Estas células han demostrado, además, corrientes de Ca^{2+} relacionadas con la conductancia de canales VOC tipo L y otro tipo de corrientes de Ca^{2+} sensibles a níquel, pero que no tienen las propiedades biofísicas de los canales VOC tipo T. La presencia de corrientes de Ca^{2+} tipo L sugiere que las *CICs-IM* exhiben potenciales de membrana espontáneos que además, son afectados por moduladores de los canales BK_{Ca} y K_V (McCloskey, 2011). Los potenciales de acción espontáneos se propagan a células adyacentes vía *uniones gap*, contribuyendo así, al desarrollo de contracciones espontáneas de la célula muscular lisa (McCloskey, 2011). El hecho que las *CICs* desarrollan un papel importante en la funcionalidad del Tracto Urinario, alteraciones en su actividad podrían estar involucradas en procesos fisiopatológicos. De hecho, la capacidad de las *CICs* de propagar señales eléctricas está incrementada en condiciones asociadas con hiperactividad del detrusor, debido a que la población de *CICs* está significativamente incrementada (McCloskey, 2011; Kanai *et al.*, 2014). En procesos inflamatorios, lesiones medulares o en el síndrome de vejiga dolorosa se incrementa la liberación de mediadores uroteliales como el ATP que potencia la actividad de las *CICs*. Asimismo, la expresión de receptores purinérgicos P2X_3 y muscarínicos M_3 está aumentada en las *CICs* debido a la obstrucción parcial de la zona de salida (Kanai *et al.*, 2014). Por otro lado, la población de *CICs* en la unión pieloureteral se encuentra disminuida en el megauréter obstructivo primario, dificultando el peristaltismo ureteral y favoreciendo la retención de orina en el uréter (Kolęda & Pilecki, 2014).

1.7. PAPEL DEL UROTELIO/SUBUROTELIO EN LA FUNCIÓN DE LA VEJIGA URINARIA

El urotelio recubre internamente gran parte de las vías urinarias, incluyendo los uréteres, la vejiga y parte de la uretra. Está constituido por tres capas: una membrana apical superficial, una capa intermedia y una membrana basal. El suburotelio está integrado por una capa formada por una rica red de capilares sanguíneos, fibras nerviosas amielinizadas y mielinizadas y tejido conectivo en íntimo contacto con las capas celulares adyacentes (Apodaca *et al.*, 2007).

El urotelio representa una barrera física protectora frente a la mayoría de sustancias presentes en la orina confiriendo protección a los tejidos subyacentes.

Alteraciones locales del pH, traumatismos mecánicos o químicos e infecciones bacterianas, pueden alterar la función protectora urotelial, provocando el paso de agua, urea y productos tóxicos a los tejidos subyacentes (fibras nerviosas y/o musculares) o bien, la liberación de sustancias neuroactivas desde el urotelio que dan lugar a cambios en la sensibilidad neuronal produciendo urgencia, incremento de la frecuencia y dolor miccional. Asimismo, la ruptura de la integridad de la barrera urotelial, está asociada a la expresión de sustancias como el factor antiproliferativo, el cual, ralentiza el crecimiento de las células uroteliales (Lewis, 2000; Apodaca *et al.*, 2007).

Además de su función protectora, las células uroteliales funcionan como transductores primarios de estímulos físicos y químicos y son capaces de comunicarse con las células subyacentes, incluyendo fibras nerviosas de la vejiga, células musculares lisas y células inflamatorias. Así, las células uroteliales son metabólicamente muy activas y están íntimamente relacionadas con funciones sensoriales y de regulación en las fases de llenado y vaciado de la vejiga urinaria (Apodaca *et al.*, 2007; Birder & Andersson, 2013). Dicha funcionalidad está acreditada por la presencia de fibras nerviosas aferentes y eferentes en la proximidad y algunas invadiendo el urotelio (Kunze *et al.*, 2006; Birder & de Groat, 2007) y por la marcada presencia, en el suburotelio, de una población de células con características morfofuncionales similares a las CICs (Ikeda *et al.*, 2007; Grol *et al.*, 2008). Estas células están acopladas eléctricamente a través de *uniones gap* que incrementan la sensibilidad y la comunicación intercelular, facilitando la propagación de señales a través del urotelio en respuesta a un estímulo (Brading & McCloskey, 2005; Ikeda *et al.*, 2007; Birder & Andersson, 2013). Asimismo, células uroteliales expresan receptores peptidérgicos, adrenérgicos, colinérgicos, bradicinérgicos, canales catiónicos, receptores del factor de crecimiento nervioso y receptores vaniloides (Birder & de Groat, 2007; Birder & Andersson, 2013). La expresión de estos receptores permite al urotelio responder a una amplia gama de impulsos sensoriales como son el estiramiento vesical durante la fase de llenado y la liberación de mediadores químicos como la ACh, el ATP, la SP o el CGRP desde nervios, células inflamatorias o capilares sanguíneos (Birder *et al.*, 2010). Asimismo, las células uroteliales pueden secretar un gran número de transmisores y/o moduladores, como la ACh, el ATP, las neurotrofinas, las prostaglandinas, el NO y las citoquinas, y por tanto, son capaces de alterar la excitabilidad de la membrana de las APSC (Birder & de Groat, 2007; Birder & Andersson, 2013).

El ATP fue uno de los primeros mediadores identificado en el urotelio, el cual, se libera desde la capa apical y basal de las células uroteliales en respuesta a la distensión

de la pared vesical durante la fase de llenado a través de la activación de receptores P2X₂ y P2X₃ del urotelio, estimulando la exocitosis y promoviendo un incremento de la superficie de las células umbrales durante el llenado vesical (Wang *et al.*, 2005). La presencia de *uniones gap* en las CICs hace que las señales generadas en el urotelio se propaguen con facilidad hacia el detrusor (Ikeda *et al.*, 2007). El ATP, liberado desde el urotelio, puede activar APSC por su conjugación a receptores ionotrópicos P2X o metabotrópicos P2Y, estimulando la generación de una señal intracelular que a su vez modula la actividad de otros canales iónicos. En fibras sensoriales, la acción del ATP incrementa las corrientes del canal TRPV1 mediado por la activación intracelular de proteínas cinasas y por la fosforilación del canal TRPV1. El aumento de la liberación del ATP en situaciones fisiopatológicas, como ocurre en la cistitis, incrementa la actividad del canal TRPV1 desempeñando un papel importante en la generación de dolor (Tominaga *et al.*, 2001). Estos receptores participan, además, en el llenado de la vejiga a través de la liberación de NO (Birder, 2006). El canal TRPA1 también se expresa en células musculares del Tracto Urinario, en APSC y en células uroteliales y su activación estaría involucrada en la hiperreflexia vesical (Streng *et al.*, 2008).

La ACh es otro factor urotelial que se libera en respuesta a la distensión vesical. La ACh ejerce su acción a través de la activación de receptores muscarínicos en el músculo liso y en el urotelio y de receptores nicotínicos presentes en las terminaciones nerviosas. El acoplamiento de la ACh a receptores muscarínicos conduce a un incremento de las concentraciones intracelulares de Ca²⁺ y facilita la liberación de NO, ATP y de un factor urotelial relajante del músculo liso. Además, la acción de la ACh en las APSC pueden conducir a alteraciones de la sensibilidad de la pared vesical (Beckel *et al.*, 2006; Hanna-Mitchell *et al.*, 2007). La presencia de fibras inmunoreactivas para la sintasa de NO, revela que el NO urotelial desempeña un importante papel en la fisiología de la micción (Birder *et al.*, 2002). La liberación de NO desde el urotelio, en respuesta a un estímulo externo, puede tener una acción facilitadora o inhibidora en la actividad de las APSC. De hecho, modificaciones en la expresión de NO, como resultado de procesos inflamatorios crónicos o lesiones de la vejiga urinaria, están íntimamente relacionadas con alteraciones de la contractilidad del detrusor (Pandita *et al.*, 2000).

En el urotelio se expresan, además, receptores adrenérgicos α y β (Birder, 2001; Tyagi *et al.*, 2009). La activación de receptores uroteliales β_3 facilitan la liberación de mediadores como el ATP y el NO y, por tanto, pueden alterar la excitabilidad de las APSC y la sensación de llenado vesical (Birder *et al.*, 2002). De la misma manera, la

activación de receptores adrenérgicos α_{1D} por catecolaminas liberadas de nervios cercanos al urotelio, facilita la actividad sensorial aferente y el reflejo de micción (Ishihama *et al.*, 2006). Por todo ello, el urotelio y/o suburotelio, además de actuar como barrera física protectora, desempeña un papel trascendental en la funcionalidad de la vejiga urinaria (Figura VII).

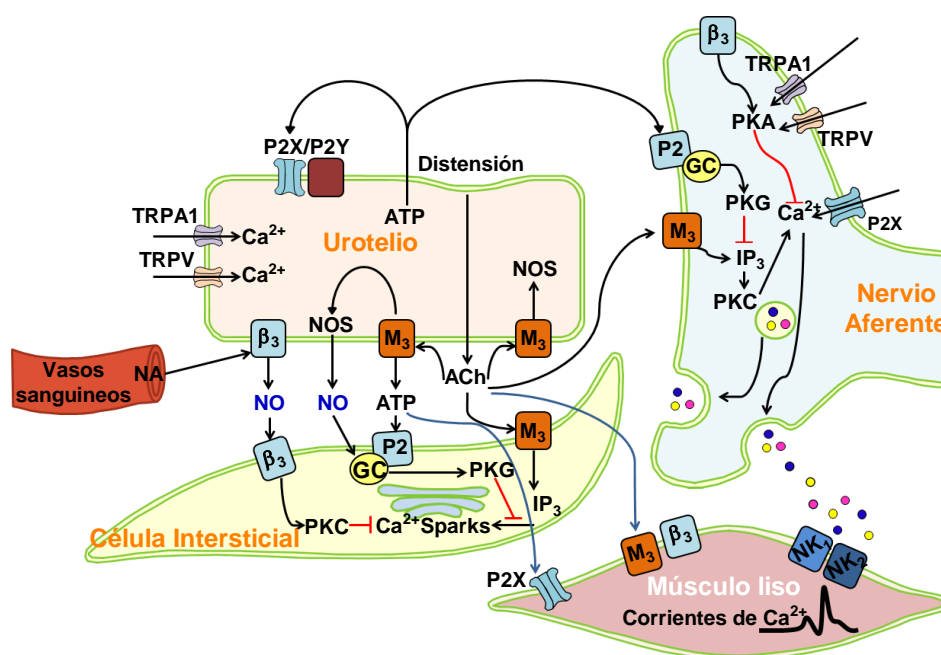


Figura VII. Hipótesis sobre el papel del urotelio en la función de la vejiga urinaria. La distensión vesical lleva a la liberación urotelial de ATP, ACh y NO que pueden actuar de forma autocrina, activando receptores y segundos mensajeros de la propia célula urotelial. Asimismo, estos mediadores pueden actuar de forma paracrina, activando receptores purinérgicos, colinérgicos y segundos mensajeros de células adyacentes (nervios, células intersticiales y musculo liso). Adaptación de (Birder & Andersson, 2013).

2. SULFURO DE HIDRÓGENO (H₂S)

El H₂S es un gas incoloro e inflamable identificado como molécula neurotransmisora en el año 2002. La mayoría de los estudios sobre dicho compuesto han incidido en sus efectos tóxicos. En la actualidad, el H₂S junto con el NO y el monóxido de carbono (CO), integran la tríada de gases neurotransmisores con importantes funciones fisiológicas y fisiopatológicas con una amplia representación orgánica. Su concentración plasmática y biodisponibilidad es regulada a nivel de su generación y consumo través de la conversión de H₂S en diferentes formas bioquímicas y es afectada por cambios de temperatura y/o pH. Entre sus funciones, destaca su papel en la regulación de la función neurológica y cardiaca, la citoprotección, la inflamación, la revascularización, la angiogénesis y la relajación de la musculatura lisa visceral y vascular. Las modificaciones en los niveles plasmáticos de H₂S y en su regulación biológica están directamente relacionados con el desarrollo de diversas patologías, por lo que se hace necesario el estudio y la comprensión de los mecanismos precisos de señalización de este gas en los diferentes tejidos y órganos en modelos fisiológicos y fisiopatológicos en aras a explorar el potencial terapéutico del H₂S y/o de los reguladores de su síntesis y de su metabolismo.

2.1. BIOSÍNTESIS Y METABOLISMO DEL H₂S

El H₂S es sintetizado en los tejidos de diversas especies incluido el hombre, involucrando tanto vías enzimáticas como no-enzimáticas.

La síntesis enzimática de H₂S, a partir de la L-cisteína, involucra la acción de dos enzimas dependientes de la piridoxal-5'-fosfato, la cistationina γ -liasa (CSE) y la cistationina β -sintasa (CBS) y por una enzima independiente de la piridoxal-5'-fosfato, la 3-mercaptopiruvatosulfuro transferasa (3-MST) (Figura VIII) (Kolluru *et al.*, 2013b; Shibuya & Kimura, 2013; Kimura, 2014). Los recientes avances en el estudio de la síntesis de H₂S han permitido identificar una nueva vía de síntesis de H₂S a partir de la D-cisteína (Shibuya & Kimura, 2013; Shibuya *et al.*, 2013). El proceso de síntesis de H₂S, a partir de la D-cisteína, involucra mecanismos diferentes a la síntesis de H₂S a partir de la L-cisteína y están íntimamente relacionados con las características del medio, por ejemplo, el H₂S sintetizado a partir de la D-cisteína, requiere un pH de 7.4 y no es dependiente de la piridoxal-5'-fosfato, mientras que el H₂S formado a partir del sustrato

L-cisteína, es óptimo a pH alcalinos y requiere la acción de enzimas dependientes de la piridoxal-5'-fosfato (Shibuya & Kimura, 2013).

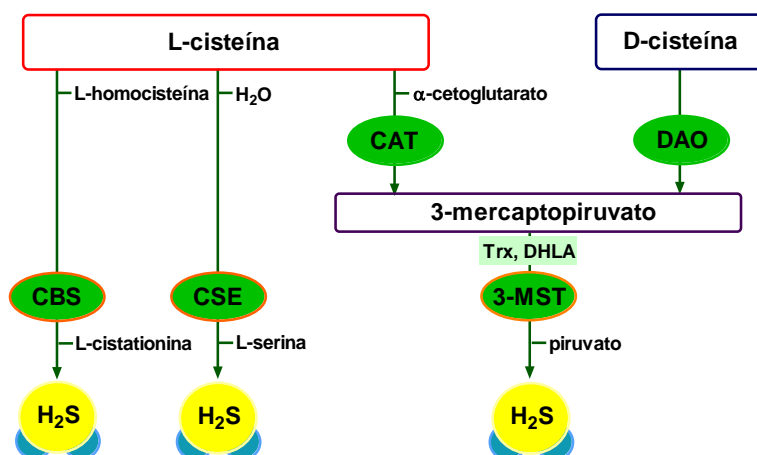


Figura VIII. Representación esquemática de las vías de síntesis de H₂S endógeno. La CBS cataliza la substitución del grupo β de la L-cisteína para formar H₂S y L-cistationina. La CSE cataliza la hidrólisis de la L-cisteína para formar H₂S y L-serina. La 3-MST sintetiza H₂S a partir del 3-mercaptopiruvato, que se forma por acción de la cisteína aminotransferasa (CAT) y D-aminoacidoxidasa (DAO) a partir de la L-cisteína y D-cisteína, respectivamente. La tiorredoxina (Trx) y el ácido dihidrolipoico (DHLA), son cofactores reductores endógenos que facilitan la liberación de H₂S del 3-mercaptopiruvato. Adaptado de (Shibuya & Kimura, 2013).

La expresión y regulación molecular de las enzimas de síntesis CBS, CSE y 3-MST depende del tipo de tejido u órgano. La CBS es la enzima que predomina en el SNC, hígado y riñón, pero también se ha identificado en el íleon, útero, placenta y en los islotes pancreáticos. Esta enzima cataliza la formación de H₂S a través de una reacción de eliminación del átomo del carbono β de la L-cisteína, formando H₂S y L-cistationina. La producción de H₂S por mecanismos dependientes de la enzima CBS se incrementa por acción de su activador alostérico, S-adenosilmetionina, y se inhibe en presencia de NO y CO (Kolluru *et al.*, 2013b; Kimura, 2014).

La CSE es la principal enzima de síntesis de H₂S en el sistema cardiovascular, íleon, placenta y riñones. En el encéfalo esta enzima apenas se detecta, no siendo su actividad relevante para la síntesis de H₂S en el SNC. En condiciones fisiológicas, la CSE puede catalizar la síntesis de H₂S a través de la escisión en β de la cisteína, formando piruvato, amonio y el intermediario tiocisteína que, en presencia de otro tiol, se descompone para formar H₂S. Sin embargo, debido a la baja concentración intracelular de cisteína, la contribución de este proceso para la generación de sulfuro no sería

relevante. Por otro lado, las altas concentraciones de homocisteína causados por la homocisteinemia dan lugar a reacciones de escisión en α,γ de la cisteína y de eliminación y generando H_2S . Siendo este proceso considerado la principal fuente de síntesis de H_2S endógeno (Kolluru *et al.*, 2013a; Kimura, 2014).

El H_2S puede además ser sintetizado por la actividad enzimática de la 3-MST. La 3-MST se expresa en el hígado, riñones y sistema vascular. Esta enzima utiliza como sustrato el 3-mercaptopiruvato, formado a partir de la reacción de transaminación de la L-cisteína con α -cetoglutarato, catalizada por la cisteína aminotransferasa y a partir de la D-cisteína como resultado de la acción catalítica de la D-aminoacidoxidasa (Shibuya & Kimura, 2013; Shibuya *et al.*, 2013; Kimura, 2014). A diferencia de las enzimas CBS y CSE, la 3-MST requiere la acción de cofactores reductores endógenos como la tioredoxina y el ácido dihidrolipoico, para facilitar la liberación de H_2S del 3-mercaptopiruvato. Por esta razón, la enzima 3-MST no fue inicialmente reconocida como una enzima productora de H_2S (Kabil & Banerjee, 2010; Kimura, 2014).

La síntesis de H_2S , via mecanismos dependientes de la CSE, se incrementa con el aumento de las concentraciones citosólicas. Así, se ha demostrado que la actividad catalítica de CSE pura se incrementa más del doble de los valores basales como consecuencia de la formación del *Complejo Ca^{2+} -calmodulina*, sin embargo, el Ca^{2+} o la calmodulina *per se* no influyen la síntesis de H_2S (Yang *et al.*, 2008; Kimura, 2014).

Una vez sintetizado, el H_2S puede ejercer sus efectos directamente a través de su interacción con diferentes moléculas de señalización intracelular, o ser almacenado, en cantidades muy bajas, y liberado más tarde en respuesta a una señal fisiológica. En los mamíferos, el H_2S se almacena formando conexiones divalentes de sulfuro con persulfatos o polisulfuros (Wang, 2012; Shibuya & Kimura, 2013). No obstante, el H_2S suele ser rápidamente metabolizado por diferentes vías. Así, dicho gas puede reaccionar con el tiol S-metiltransferasa, conduciendo a su metilación y formación de sulfuro de dimetilo y metanotiol (Barr & Calvert, 2014). El H_2S puede además ser catabolizado por desprotonación seguido de una oxidación mitocondrial, proceso que se produce en varios tejidos, como el encéfalo, el pulmón, el riñón y el intestino y que descompone el H_2S en persulfato, sulfito, tiosulfato y sulfato (Kabil & Banerjee, 2010; Barr & Calvert, 2014). El sulfato formado de la oxidación de H_2S corresponde a más del 70% del total de sulfuro urinario (Kabil & Banerjee, 2010). El H_2S también puede interaccionar con hemoderivados que están íntimamente relacionados con la síntesis de CO (Barr & Calvert, 2014).

2.2. INTERACCIONES DE GASES NEUROTRANSMISORES

Las moléculas gaseosas neurotransmisoras pueden interaccionar para potenciar y/o antagonizar sus efectos biológicos celulares en tres niveles: en la regulación de su síntesis, en sus dianas moleculares y en los mecanismos de interacción directa entre sí (Coletta *et al.*, 2012; Prabhakar, 2012; Barr & Calvert, 2014).

El H₂S y NO están íntimamente relacionados en la regulación de procesos de angiogénesis y vasorelajación dependiente del endotelio. El H₂S incrementa las concentraciones intracelulares de GMPc, activando la PKG, de forma dependiente del NO endotelial. La inhibición de la isoforma eNOS o de la PKG elimina el crecimiento angiogénico y disminuye la vasorelajación. La inhibición de la CSE reduce tanto la angiogénesis como la relajación dependiente del NO (Coletta *et al.*, 2012). El H₂S no regula de forma directa las concentraciones intracelulares de GMPc, más bien, se cree que puede tener un papel en la regulación de la actividad de la PDE5, inhibiendo su actividad y evitando la degradación del GMPc (Salloum *et al.*, 2009; Coletta *et al.*, 2012; Fusco *et al.*, 2012). Además, el H₂S puede regular la síntesis de NO endotelial, incrementando su biodisponibilidad, a través de la activación de la enzima eNOS por mecanismos dependientes de la vía PI3K/Akt, cuya interacción está involucrada en el control de la función vascular y en la angiogénesis (Coletta *et al.*, 2012; Polhemus & Lefer, 2014) y en la protección de la insuficiencia cardíaca inducida por sobrecarga de presión (Kondo *et al.*, 2013). Por otro lado, el NO también puede regular la formación endógena del H₂S modulando la actividad de la sintasa CSE (Zhao *et al.*, 2001; Barr & Calvert, 2014). En la arteria aorta de la rata, el NO incrementa la expresión y la actividad de la enzima CSE, aumentando las concentraciones endógenas de H₂S (Zhao *et al.*, 2001; Polhemus & Lefer, 2014) (Figura IX).

Aunque las interacciones entre H₂S y CO son menos conocidas, no obstante, se ha demostrado que el CO puede modular la síntesis de H₂S (Coletta *et al.*, 2012; Prabhakar, 2012; Polhemus & Lefer, 2014). El CO es sintetizado durante la degradación del grupo hemo por acción de las hemo-oxigenasas (HOs), tanto constitutiva (HO-2) como inducible (HO-1). La inhibición de las HOs incrementa las concentraciones basales de H₂S en el cuerpo carotídeo, bajo condiciones de normoxia, vía mecanismos dependientes de la CSE. Asimismo, donantes de CO, como el CORM-2, inhiben la síntesis de H₂S (Peng *et al.*, 2010; Prabhakar, 2012). lo que sugiere que el CO desempeña un papel fundamental en la regulación de la síntesis de H₂S actuando como un inhibidor

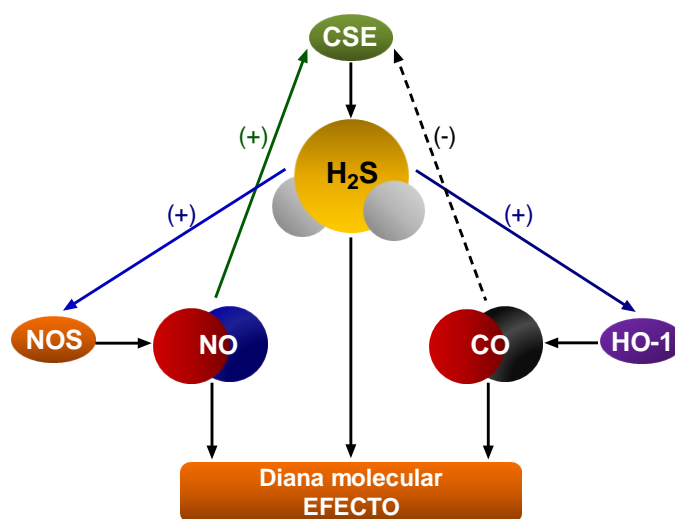


Figura IX. Esquema de las principales interacciones entre los gases neurotransmisores. El NO puede regular al alza la actividad de la enzima CSE incrementando la síntesis de H₂S y sus efectos biológicos. El CO disminuye la actividad de la CSE reduciendo su biodisponibilidad. El H₂S aumenta la actividad de la NOS y HO-1, aumentando la síntesis de NO y CO, respectivamente.

2.3. H₂S Y CANALES IÓNICOS

HEK-293, sin embargo, el H₂S no afecta dichas corrientes (Jiang *et al.*, 2010). El efecto estimulador del canal K_{ATP} inducido por H₂S apenas se observa cuando el gene de la subunidad rvSUR₁ se expresaba conjuntamente con lo de la subunidad K_{ir}6.1. Así, se acepta que la subunidad SUR₁ del K_{ATP} es la diana del H₂S. La aplicación extracelular del agente de sulfidril alquilante, N-etilmaleimida (NEM) reduce el efecto del H₂S sobre el complejo K_{ir}6.1/SUR₁. El NEM reacciona frente a tioles para modificar los residuos de cisteína en las proteínas. Este compuesto no afecta a las corrientes de K_{ir}6.1/SUR₁ *per se*. En ausencia de H₂S no existen grupos sulfidril en el bucle extracelular de la subunidad SUR₁ disponible para la reacción del NEM. Así, el H₂S rompería la unión de los residuos de cisteína en el bucle extracelular donde el NEM puede reaccionar con el grupo tiol libre (Jiang *et al.*, 2010). De los residuos extracelulares de cisteína únicamente la sustitución del residuo 6 o 26 conduce a la pérdida de la sensibilidad del canal al H₂S. Esto sugiere que los residuos de cisteína 6 y 26 de la subunidad SUR₁ son la diana molecular del H₂S (Jiang *et al.*, 2010). Sin embargo, todavía no se conoce si estos dos residuos contribuyen para la formación de uniones covalentes con otros residuos de cisteína de la subunidad K_{ir}6.1. La activación de los K_{ATP} por el H₂S también podría resultar debido a la ruptura de uniones covalentes o de un proceso de S-sulfidración por formación de persulfitos entre el H₂S y los residuos de cisteína libres (Tang *et al.*, 2010).

El papel del H₂S en la modulación de la actividad de los canales K_{Ca} y K_V también ha sido investigado en arterias y en cultivos celulares (Figura X) (Tang *et al.*, 2010). Así, el H₂S activa canales SK_{Ca} e IK_{Ca} endoteliales de arterias mesentéricas favoreciendo la liberación de factores hiperpolarizantes (Bełtowski & Jamroz-Wiśniewska, 2014). La vasodilatación inducida por el H₂S es producida a través de la activación de canales BK_{Ca} vía mecanismos dependientes de las “Ca²⁺ sparks” (Liang *et al.*, 2012; Jackson-Weaver *et al.*, 2013). Estudios electrofisiológicos mostraron, asimismo, que el H₂S podría reducir la probabilidad de apertura del canal BK_{Ca} por mecanismos dependientes de la subunidad α sin alterar su conductancia. La inhibición del canal BK_{Ca} inducida por H₂S no altera la sensibilidad del canal al Ca²⁺ intracelular por lo que la diana objeto de sulfidración por el H₂S sigue sin identificar, aunque se cree que está localizada en la subunidad α del canal (Telezhkin *et al.*, 2010). El H₂S regula la actividad de canales K_V4.3 en el estómago de ratones, inhibiendo su actividad por un proceso de sulfidración inducida en el grupo tiol del canal K_V4.3 (Liu *et al.*, 2014). Asimismo, el H₂S activa canales K_V7 en arterias coronarias del cerdo (Figura X) (Hedegaard *et al.*, 2014).

El H₂S activa canales VOC tipo L en neuronas y receptores de rianodina, funcionando como regulador de la homeostasis del Ca²⁺ intracelular. Sin embargo, en los cardiomiocitos, el H₂S actúa como inhibidor de los canales VOC tipo L. En APSC, el H₂S regula al alza la actividad de canales VOC tipo T y canales TRPA1 y TRPV1, promoviendo, en última instancia, la contracción del músculo liso visceral y favoreciendo la secreción de Cl⁻ de la mucosa del colon (Figura X) (Tang *et al.*, 2010). La actividad de varios canales puede ser modulada por el H₂S, sin embargo, el mecanismo concreto del efecto del H₂S sobre dichos canales no es de todo conocido, siendo la sulfidación de residuos de cisteína una posible explicación.

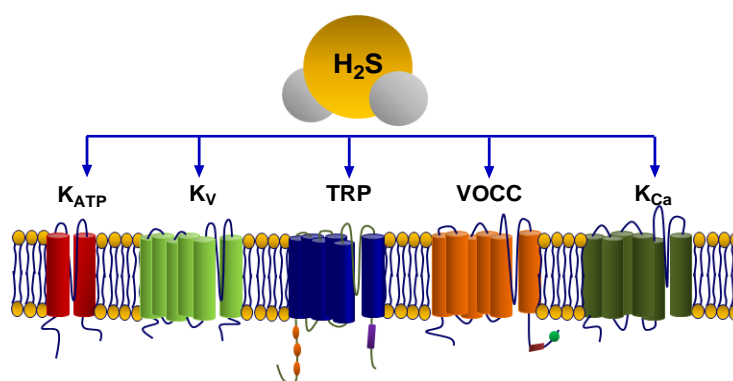


Figura X. Principales canales iónicos dianas moleculares del H₂S. El H₂S activa canales K_{ATP} y los TRPA1 y TRPV1 que son sus principales dianas moleculares. Asimismo puede activar y/o inhibir canales K_{Ca}, K_v y VOC, dependiendo del subtipo y de las subunidades que componen el canal.

2.4. ACCIÓN BIOLÓGICA DEL H₂S

2.4.1. Sistema Cardiovascular

Efecto cronotrópico e inotrópico

El H₂S puede alterar la función cardíaca ejerciendo efectos cronotrópicos e inotrópicos (Wang, 2012). La acción cronotrópica negativa inducida por el H₂S se debe a la disminución de la actividad de las células marcapasos del nódulo sinusal. De hecho, el donante de H₂S, NaHS, (50-200 μM), reduce la velocidad de la despolarización diastólica y la ráfaga de señales marcapasos de células sanas del nódulo sinusal. La inhibición de

los canales K_{ATP} anula el efecto cronotrópico inducido por el NaHS (Xu *et al.*, 2008; Wang, 2012). Además, el NaHS mejora la arritmia cardíaca vía activación de canales K_{ATP} . Dicho donante incrementa la probabilidad de apertura de los canales K_{ATP} de los miocitos cardiacos, disminuyendo la arritmia cardíaca (Zhang *et al.*, 2007; Wang, 2012).

Estudios *in vivo* muestran que la administración intravenosa de 2,8 - 14 $\mu\text{mol/kg}$ de H_2S en ratas no altera la frecuencia cardíaca aunque disminuye significativamente la presión arterial (Zhao *et al.*, 2001). La perfusión continua del inhibidor de la síntesis de H_2S , DL-propargilglicina (PPG), no modifica los potenciales de acción de las células marcapasos del nodo sinusal del conejo (Xu *et al.*, 2008; Wang, 2012), aunque, concentraciones muy altas de dicho bloqueante alteran la frecuencia cardíaca (Wang, 2012).

El H_2S ejerce, asimismo, un efecto inotrópico negativo, incrementando la fuerza de la contracción cardíaca (Sitdikova *et al.*, 2011; Wang, 2012). En el miocardio de la rana, el NaHS disminuye la amplitud de la contracción muscular en condiciones normales y en presencia del bloqueante de los canales VOC tipo L. Sin embargo, en presencia de glibenclamida, el NaHS ejerce un efecto inotrópico positivo en los primeros minutos de su administración. Ni el bloqueo de los K_{ATP} ni su activación, modulan el efecto inotrópico negativo inducido por NaHS. El bloqueo de canales de K_{Ca} o K_V incrementan la amplitud de la contracción cardíaca y no altera el efecto inotrópico negativo del NaHS (Sitdikova *et al.*, 2011). En el corazón de la rata, la glibenclamida, bloqueante de los canales K_{ATP} , inhibe el efecto inotrópico negativo dependiente del NaHS, imitando el efecto inducido por los activadores de los K_{ATP} (Sivarajah *et al.*, 2009). Así, la activación de los canales K_{ATP} desempeñan un papel importante en la regulación inotrópica negativa inducida por el H_2S (Wang, 2012).

Efecto vasodilatador

El H_2S ejerce, asimismo, vasodilatación en una amplia variedad de lechos vasculares como son la arteria aorta, mesentérica y cerebral y vena porta de varias especies animales, como ratón, rata, cobaya, oveja y vaca y en el hombre (Wang, 2012). Los valores de pD_2 de la vasorelajación inducida por el H_2S son similares a los niveles basales de las concentraciones plasmáticos de H_2S (1-160 μM), lo que sugiere que, en condiciones fisiológicas, el H_2S regula el tono basal vascular de las arterias de resistencia (Wang, 2012). La potencia de la relajación inducida por el H_2S puede variar con el tipo

de donante usado. Así, se ha descrito que el efecto vasodilatador inducido por la misma concentración de H₂S aplicado en la forma de solución gaseosa es más potente que el inducido por el donante NaHS (Zhao & Wang, 2002). La sensibilidad del tipo de lecho vascular también es un factor que contribuye para la potencia de la relajación del H₂S, siendo las arterias mesentéricas de resistencia más sensibles que la arteria aorta a pesar de la similitud en las concentraciones basales de H₂S en ambos lechos vasculares (Cheng *et al.*, 2004; Wang, 2012). Una posible explicación para las diferencias encontradas en la potencia del efecto vasodilatador puede ser la distribución específica de las dianas moleculares del H₂S en los diferentes lechos vasculares (Wang, 2012). Los canales K_{ATP}, considerados la principal diana molecular del H₂S, presentan diferentes isoformas que pueden variar dependiendo del tejido vascular. Otra posible causa podría estar relacionada con que la sensibilidad de las proteínas contráctiles para el H₂S y el Ca²⁺ intracelular puede variar de arterias a arteriolas (Wang, 2012). Las diferencias en las concentraciones de O₂ pueden ser otro de los motivos encontrados para justificar las variaciones en la potencia del efecto vasorelajante del H₂S (Wang, 2012). El H₂S relaja la musculatura vascular lisa a concentraciones fisiológicas de O₂ siendo dicho efecto más potente a concentraciones fisiológicas más bajas. A altas concentraciones de O₂, el H₂S puede producir vasoconstricción como consecuencia, probablemente, de los metabolitos resultantes de la oxidación de H₂S y no un efecto *per se* como tal (Koenitzer *et al.*, 2007).

Los canales K_{ATP} representan la diana molecular del H₂S más bien caracterizada en sus efectos hiperpolarizante y relajante del miocito vascular (Zhao *et al.*, 2001; Tang *et al.*, 2005; Wang, 2012). En arterias mesentéricas de la rata, el H₂S incrementa la amplitud de las corrientes de canales K_{ATP}, así como, su probabilidad de apertura (Tang *et al.*, 2005). Asimismo, la inyección intravenosa de H₂S disminuye la presión arterial de ratas cuyo efecto es inhibido con el bloqueo previo de los canales K_{ATP}, lo que está en consonancia con lo observado en estudios *in vitro* en donde el H₂S relaja la arteria aorta activando directamente los canales K_{ATP} (Zhao *et al.*, 2001; Tang *et al.*, 2005). Asimismo, el donante de nueva síntesis de H₂S, GYY4137 relaja la arteria ciliar bovina vía activación de canales K_{ATP} (Chitnis *et al.*, 2013).

En el músculo liso vascular, la actividad de canales VOC tipo L puede ser regulada por el H₂S. Así, el H₂S inhibe el flujo de Ca²⁺ extracelular por mecanismos dependientes del canal VOC tipo L en la aorta de la rata (Sun *et al.*, 2008), mientras que en la arteria mesentérica de la rata (Jackson-Weaver *et al.*, 2013) y en arteriolas cerebrales del cerdo (Liang *et al.*, 2012) el H₂S induce vasorelajación a través de la activación de los canales

BK_{Ca} vía mecanismos dependientes de las “Ca²⁺ sparks”. En las arterias coronarias del cerdo, la activación de canales K_v7 por el H₂S podría estar involucrada en la vasodilatación inducida por la hipoxia (Hedegaard *et al.*, 2014).

En la mesentérica de la rata, el NaHS facilita la liberación de neurotransmisores sensoriales desde las APSC. La desensibilización de dichas fibras sensoriales con capsaicina y el bloqueo de los receptores de CGRP disminuyen la vasorelajación inducida por el donante de H₂S, NaHS, siendo dicho efecto producido vía mecanismos independientes de la vía GMPc/PKG (White *et al.*, 2013). Sin embargo, la inhibición de canales endoteliales SK_{Ca} e IK_{Ca}, reduce parcialmente el efecto vasodilatador. La inhibición conjunta de los canales SK_{Ca}, IK_{Ca} y K_{ATP} inhibe la respuesta relajante inducida por el H₂S de arterias mesentéricas con urotelio intacto. En preparaciones desprovistas de urotelio, el bloqueo de los canales K_{ATP} disminuye el efecto vasodilatador inducido por H₂S, sin embargo, no es afectado como consecuencia de la inhibición de los canales SK_{Ca} e IK_{Ca}, lo que sugiere en conjunto, que el H₂S, sintetizado en células endoteliales, produce vasodilatación involucrando mecanismos dependientes e independientes del urotelio (Beltowski & Jamroz-Wiśniewska, 2014).

Curiosamente, el H₂S también puede inducir un efecto vasococnstrictor. De hecho, bajas concentraciones de H₂S producen contracción de la aorta como consecuencia de la formación de S-nitrosotiol al reaccionar con NO endotelial y revierten el efecto vasodilatador inducido por la ACh y la histamina (Ali *et al.*, 2006; Whiteman *et al.*, 2006). Además, bajas concentraciones de NaHS incrementan la presión media arterial de ratas anestesiadas (Ali *et al.*, 2006). La actividad contráctil del H₂S, se atribuye, probablemente a la inhibición del enzima NOSe (Kubo *et al.*, 2007b; Coletta *et al.*, 2012). El efecto vasoconstrictor inducido por el H₂S también puede involucrar una regulación a la baja del AMPc citosólico de la célula muscular lisa vascular (Lim *et al.*, 2008). Finalmente, concentraciones variables de H₂S pueden modular el tono vascular de manera antagónica, sugiriendo así, la implicación de diferentes mecanismos de señalización intracelular (Dombkowski *et al.*, 2005).

2.4.2. Sistema Respiratorio

La acción del H₂S en el Sistema Respiratorio es menos conocida que en el Sistema Cardiovascular. En las vías aéreas de conducción, se ha identificado la expresión de las

tres enzimas de síntesis de H₂S, CBS, CSE y 3-MST, lo que sugiere que H₂S endógeno puede participar en la contractilidad de la musculatura lisa (Wang, 2012; Rashid *et al.*, 2013). En preparaciones de bronquiolos de ratón y de cobaya, el NaHS no afecta la tensión basal (Kubo *et al.*, 2007a; Wang, 2012), pero, sin embargo, en preparaciones precontraídas con carbacol, el NaHS causa una potente broncodilatación en el ratón y moderada relajación de los bronquiolos de cerdo (Kubo *et al.*, 2007a). A pesar de que el canal K_{ATP} no esté involucrado en la relajación inducida por el H₂S en las vías aéreas no se descarta la posible implicación de otros canales de K⁺. De hecho, en la tráquea de ratón, el NaHS y la L-cisteína producen relajación vía mecanismos dependientes e independientes del epitelio e involucrando la activación de canales BK_{Ca} presentes en la membrana del músculo liso (Huang *et al.*, 2014).

En preparaciones de músculo liso de las vías aéreas del hombre, el H₂S produce broncodilatación a través de la inhibición del influjo de Ca²⁺ extracelular vía canales VOC tipo L sin modificar la liberación de Ca²⁺ del RS (Ryu *et al.*, 2009). En los bronquiolos de ratón, donantes de H₂S producen relajación involucrando mecanismos independientes de la vía de la GCs/PKG (Castro-Piedras & Perez-Zoghbi, 2013). En contraste, el NaHS puede además, contraer bronquios de cobaya modulando la liberación de neuropéptidos excitadores vía activación de canales TRPV1 de APSC (Trevisani *et al.*, 2005).

2.4.3. Sistema Gastrointestinal

En el Sistema Gastrointestinal se expresan las enzimas CSB y CSE en las neuronas entéricas, la mucosa y en el músculo liso. Asimismo, la flora bacteriana característica de este Tracto genera H₂S (Wang, 2012). Las altas concentraciones de H₂S presentes en el músculo liso gastrointestinal sugieren que este gas participa en la regulación de su motilidad. En el íleon de conejos y cobayas, el H₂S reduce la actividad espontánea (Hosoki *et al.*, 1997; Teague *et al.*, 2002). En preparaciones de colon y yeyuno de la rata, ratón y del hombre, el H₂S inhibe la actividad espontánea vía activación de canales SK_{Ca} (Gallego *et al.*, 2008). En el antro gástrico del ratón y del cobaya, el H₂S produce tanto contracción como relajación. Así, bajas concentraciones de H₂S, aumentan la actividad espontánea y el tono basal cuyo mecanismo involucra la inhibición directa de canales K_v4.3 (Liu *et al.*, 2014). Sin embargo, a altas concentraciones, el H₂S reduce la actividad espontánea vía activación de canales K_{ATP} (Zhao *et al.*, 2009; Han *et al.*, 2011; Huang *et al.*,

2013). En el músculo liso del fundus gástrico y del colon distal, la inhibición de la vía del GMPc y AMPc, así como de canales de K^+ y la desensibilización de APSC no modifican la respuesta del H_2S , la cual, estaría relacionada con la actividad de la MLCP (Dhaese & Lefebvre, 2009; Dhaese *et al.*, 2010). En el colon distal, la relajación inducida por NaHS no es acompañada por una disminución de las concentraciones de Ca^{2+} intracelulares, indicando que mecanismos de desensibilización al Ca^{2+} podrían estar involucrados. Dichos mecanismos, sin embargo, no parecen estar relacionados con la inhibición de la vía de las Rho-cinasa o de la activación de la MLCP (Dhaese *et al.*, 2010). El H_2S induce un efecto antagónico en la motilidad duodenal de la rata, donde el H_2S endógeno ejerce apenas un efecto contráctil. El efecto excitador inducido por el NaHS es mediado por la liberación de la SP desde las APSC, vía activación de canales TRPV1. Dicho efecto contráctil es transitorio y se continúa con una respuesta relajante mediada por la activación de canales K_{ATP} (Lu *et al.*, 2014).

2.4.4. Tracto Urinario

Las acciones del H_2S en el Tracto Urinario están escasamente estudiadas y se circunscriben únicamente al músculo detrusor. Así, el donante NaHS, a concentraciones elevadas, produce contracción del detrusor, efecto abolido como consecuencia de la desensibilización de las APSC (Patacchini *et al.*, 2004). De hecho, el NaHS activa canales TRPV1 de APSC induciendo la liberación de NKA (Patacchini *et al.*, 2005). En preparaciones precontraídas con ACh del detrusor de la rata y del hombre, el NaHS produce, sin embargo, una relajación de pequeña magnitud a través de la activación de los canales K_{ATP} (Gai *et al.*, 2013).

2.4.5. Otros efectos fisiológicos

Además de la regulación de la contractilidad de la musculatura lisa visceral y vascular y músculo cardíaco, el H_2S participa en funciones, tales como, la neuromodulación, la proliferación celular y procesos secretores (Wang, 2012).

El H_2S regula la función neuronal actuando como neuromodulador (Kimura, 2013). A concentraciones fisiológicas, el H_2S regula la homeostasis del Ca^{2+} intracelular de células neuronales, vía activación de canales VOC tipo L, facilitando así, la liberación

de neurotransmisores (Yong *et al.*, 2010). En el SNC, el H₂S promueve la liberación de glutamato (Austgen *et al.*, 2011) y en el SNA facilita la liberación de ACh desde terminaciones preganglionares, modulando así, la función gastrointestinal (Sha *et al.*, 2013).

El H₂S funciona, también, como un importante modulador de la proliferación celular y de la apoptosis (Yang *et al.*, 2011; Wang, 2012). El H₂S induce apoptosis de células musculares de la aorta humana vía activación de la cinasa regulada por la señal extracelular (ERK) y la caspasa-3 (Yang *et al.*, 2004). Asimismo, el H₂S puede inducir proliferación de células endoteliales posiblemente a través de la estimulación de la vía PI-3K/Akt, de canales K_{ATP}, de la proteína cinasa activada por mitogeno (MAPK) y la inhibición de la vía de la GCs/GMPc (Wang, 2012).

En células de las islotes pancreáticos, se ha identificado la expresión de la CSE, lo que sugiere que el H₂S desempeña un importante papel en la regulación de la secreción de insulina. La aplicación exógena de concentraciones fisiológicas de H₂S (Yang *et al.*, 2005), así como del sustrato de síntesis L-cisteína (Kaneko *et al.*, 2006), inhiben la liberación de insulina, vía activación de canales K_{ATP} de las células beta. Los efectos del H₂S en las células pancreáticas podrían representar una herramienta terapéutica para la regulación del metabolismo de la insulina, así como para la homeostasis de la glucosa (Wang, 2012).

2.5. POTENCIAL TERAPÉUTICO DEL H₂S

En el Sistema Cardiovascular, la disfuncionalidad de los mecanismos sulfidráulicos está asociada con el desarrollo de hipertensión, aterosclerosis e infarto de miocardio (Wang, 2012; Guo *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013). La expresión y la actividad de la CSE están disminuidas en el tejido vascular de ratas hipertensivas y en pacientes con enfermedad coronaria (Wang, 2012; Zhang *et al.*, 2013). La administración de donantes de H₂S disminuye la hipertensión inducida por el bloqueo de la sintasa de NO, lo que sugiere que mecanismos sulfidráulicos estarían involucrados en la patología de la hipertensión. El efecto antihipertensor inducido por el H₂S es mediado por la activación de canales K_{ATP}. Asimismo, el H₂S puede tener un efecto modulador de la NOSe incrementando su actividad y la síntesis de NO que reduce la presión arterial (Wang, 2012; Zhang *et al.*, 2013). En la isquemia del miocardio, el H₂S mejora su recuperación

funcional (Guo *et al.*, 2013). Dado que el H₂S es un potente agente vasodilatador, agentes que regulen la actividad de la CSE y/o donantes de H₂S podrían ser fármacos efectivos en el tratamiento de la hipertensión (Zhang *et al.*, 2013).

El H₂S podría estar, asimismo, involucrado en la patogénesis y el tratamiento de la aterosclerosis. Uno de los principales acontecimientos en el desarrollo de dicha vasculopatía es la proliferación y/o apoptosis de las células musculares lisas. Esto conlleva al incremento de la síntesis de H₂S vía proteína específica-1/CSE. El H₂S disminuye la proliferación celular induciendo la apoptosis por mecanismos dependientes de la PI-3K/Akt y MAPK (Wang, 2012). Asimismo, el H₂S puede interrumpir el desarrollo de la aterosclerosis inhibiendo la formación de las células espumosas, regulando a la baja la expresión de los receptores *scavengers* CD36 y SR-A, disminuyendo la expresión de la acil-CoA colesterol aciltransferasa-1 (ACAT-1) e inhibiendo la unión y captación macrofagocitaria de la lipoproteína oxidada de baja densidad (oxiLDL) (Zhang *et al.*, 2013).

La disminución de la producción de H₂S y de la expresión de la CSE están relacionadas con el establecimiento de cuadros de hipertensión pulmonar, asma y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (Wang, 2012). En modelos animales de hipertensión pulmonar, la administración de NaHS disminuye la presión sistólica de la arteria pulmonar y mejora la hipoxia crónica (Wang, 2012; Guo *et al.*, 2013). Un mecanismo de interacción entre el H₂S con el NO y el CO podría ser el principal mecanismo de regulación implicado en la mejoría inducida por el H₂S en la hipertensión pulmonar y la hipoxia. El H₂S puede regular al alza la vía de la HO-1/CO y regular a la baja la vía de la NOS/NO, reduciendo así, la hipertensión pulmonar. La administración intraperitoneal de donantes de H₂S disminuye la inflamación pulmonar y podría mejorar episodios de asma y de EPOC (Wang, 2012). La severidad de la patología asmática es directamente proporcional a la disminución en las tasas de H₂S, por lo que la cuantificación de los niveles plasmáticos de H₂S podrían constituir un biomarcador fiable para el diagnóstico del asma (Wang, 2012).

En el Sistema Gastrointestinal, el H₂S, además de regular la motilidad intestinal, desempeña importantes funciones antiinflamatorias en algunos tipos de gastritis y colitis probablemente modulando mecanismos de secreción de factores inflamatorios (Wang, 2012; Guo *et al.*, 2013).

En la diabetes, se ha observado un incremento de la expresión de la CSE y producción de H₂S. El incremento de las concentraciones de H₂S puede inducir

apoptosis de las células beta secretoras de insulina, por incrementar el stress del retículo sarcoplásmico vía activación de la p38 MAPK. Así, el incremento de las concentraciones de H₂S contribuye a la patogénesis de la diabetes mellitus (Wang, 2012; Zhang *et al.*, 2013). Esta hipótesis fue inicialmente observada en un modelo de rata Zucker, que representan un modelo animal de modificación genética que induce la diabetes mellitus tipo 2 y se caracteriza por presentar hiperglucemia y resistencia a la insulina, en donde la inhibición de la CSE disminuye la producción endógena de H₂S, incrementa los niveles plasmáticos de insulina y reduce la hiperglucemia (Wang, 2012). Así, el manejo farmacológico de la vía CSE/H₂S, podría constituir una nueva estrategia terapéutica en la diabetes mellitus tipo 2.

La administración de donantes de H₂S a varias líneas de células cancerígenas, ha demostrado que produce muerte celular, siendo este efecto dependiente de concentraciones crecientes de H₂S. Esto indica que donantes de H₂S podrían representar un potencial terapéutico como fármacos anticancerígenos (Zhang *et al.*, 2013). Además, antiinflamatorios no esteroideos acoplados químicamente a donantes de liberación lenta de H₂S han demostrado inhibir efectivamente el crecimiento de células cancerígenas del colon, células mamarias, pancreáticas, prostáticas, pulmonares y células de la medula ósea del hombre ya que promueve la apoptosis celular vía activación de la MAPK p38 (Wang, 2012; Zhang *et al.*, 2013).

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Las funciones del Tracto Urinario están relacionadas con el transporte, almacenamiento y la eliminación periódica de orina. Para ello es necesario una correcta coordinación de los mecanismos de contracción y/o relajación de la musculatura lisa del uréter y de la vejiga urinaria. Alteraciones de dichos estos mecanismos pueden dar lugar a la disfuncionalidad motora de la pared vesical y favorecer el establecimiento de patologías urinarias como son el enclavamiento de cálculos ureterales en la pared ureteral, el reflujo vesicoureteral y la incontinencia urinaria.

El cólico renal es causado por una obstrucción ureteral aguda, parcial o completa, que en un 90% de los casos suele ser debida a la presencia de un cálculo enclavado que provoca una distensión aguda de la pared del uréter. En un 5-10% de los casos es debido a patologías urinarias no litiásicas, como ocurre en el denominado Síndrome de la Unión Pieloureteral causado por la presencia de coágulos, tumores renales, atonía ureteral por pielonefritis, necrosis papilar y/o neoplasias uroteliales. La obstrucción ureteral aguda provoca un aumento brusco de la presión intraluminal, que se extiende a las terminaciones nerviosas nociceptivas localizadas en la submucosa y en la lámina propia de la cápsula renal peripielica (responsables del dolor renal), la pelvis renal (responsables del dolor renoureteral), y en menor densidad, en el uréter proximal. Además, el músculo liso de la pared ureteral se contrae en el intento de expulsar el agente responsable de la obstrucción. El cólico renal está considerado una urgencia urológica frecuente ya que se hace acompañar de un dolor muy agudo, por lo que requiere un rápido diagnóstico y tratamiento. Se estima que más de 12% de la población sufrirá un cólico renal durante su vida siendo la tasa de recurrencia alrededor de un 50%. Los objetivos del tratamiento son establecer un buen control del dolor y conservar al máximo la función renal suprimiendo o aliviando los efectos de la obstrucción ureteral (Shokeir, 2001; Xu *et al.*, 2013).

El reflujo vésicoureteral (RVU), según el *Comité Internacional para el Estudio del Reflujo*, consiste en el paso retrógrado o contracorriente de la orina de la vejiga al uréter. Es una de las patologías urinarias más frecuentes en la población infantil hasta los 3 años. Tiene una prevalencia entorno al 2% y suele acompañarse, en un 50% de los casos, de infección de las vías urinarias y con marcado componente genético (Baek & Kim, 2013). Para evitar la aparición de un RVU es imprescindible una unión ureterovesical con su dispositivo valvular intacto. El uréter entra a la vejiga en un trayecto oblicuo intramural y luego submucoso para desembocar en el ángulo del triángulo. A nivel del hiato ureteral, las fibras del detrusor se fijan al uréter sujetando,

así, el uréter a la entrada de la vejiga de manera laxa. El detrusor ofrece al uréter intravesical un sostén posterior sólido y fijo. La longitud del trayecto submucoso del uréter crece con la edad, triplicándose entre el nacimiento y los 12 años. Durante el llenado, la presión intravesical aumenta muy poco y el vaciamiento ureteral se efectúa por una presión ureteral superior a la de la vejiga. En cambio durante el vaciado, la contracción del trigono desciende el meato y lo coloca contra la pared muscular, el hiato ureteral se cierra por contracción del detrusor y el trigono y la presión intravesical comprime el uréter submucoso, por lo que cualquier cambio en la posición y forma del uréter en su trayecto intravesical altera dicho dispositivo antirreflujo. Hay que diferenciar los reflujos pasivos presentes sólo durante el llenado vesical y los reflujos activos visualizados durante la micción, constituyendo, estos últimos, los verdaderos reflujos patológicos. Se han descrito dos formas de presentación de dicha patología, la primaria y la secundaria (Baek & Kim, 2013). El RVU primario o idiopático, se produce como consecuencia de una anomalía congénita de la unión ureterovesical. Dicha anomalía es producida por la laxitud del trigono, una deficiencia de las fibras musculares del uréter intravesical y/o un trayecto submucoso muy corto secundario a un meato urinario ectópico. Este cuadro suele desaparecer de forma espontánea con el crecimiento, especialmente en los primeros años de vida, por maduración de la unión ureterovesical y crecimiento en la longitud del uréter intravesical. El RVU secundario está relacionado, sin embargo, con una alteración en la disposición anatómica del uréter distal producida como consecuencia de la lesión quirúrgica de los mecanismos valvulares ureterales, la esclerosis del detrusor y la vejiga neurogénica, procesos que cursan con parálisis parcial o total del detrusor y el trigono originando un vaciamiento incompleto de la vejiga, así como, por anomalías congénitas de la unión ureterovesical, como sucede en el uréteroceles y/o en el uréter ectópico de implantación extravesical (Celik *et al.*, 2014). El tratamiento del RVU secundario corresponde a la etiología de base, la terapia del reflujo primario va dirigida a la profilaxis antibiótica con el objeto de mantener la orina estéril en espera de la resolución espontánea del mismo. La corrección quirúrgica está indicada cuando el tratamiento farmacológico fracasa, como consecuencia de infecciones urinarias recurrentes y/o por mala tolerancia a la medicación, o en el caso de reflujos masivos (Baek & Kim, 2013).

La Incontinencia Urinaria (IU) según la *Sociedad Internacional de Continencia* (ICS) es definida como: “la pérdida involuntaria de orina objetivamente demostrable que origina un

problema social o higiénico”, proceso, que en los últimos años, ha experimentado una creciente atención debido al envejecimiento de la población (Dingwall, 2008). Esta patología afecta a todos los grupos de población, edad y sexo. Estudios epidemiológicos llevados a cabo en Estados Unidos en el año 2000 revelaban que el 55% de mujeres y el 34% de hombres mayores de 60 años, así como, un 42% de mujeres y un 5% de hombres menores de 60 años padecían diferentes grados de IU con un tratamiento de elevado coste económico. En España, el gasto en absorbentes en 2001 fue de 197 millones de euros, lo que representa un 3.2% del importe total de la prestación farmacéutica del Sistema Nacional de Salud. A pesar de esta elevada prevalencia global, sorprende el escaso número (20% de los casos) de consultas médicas que se generan por este motivo. Las IU se clasifican, de acuerdo al cuadro sintomatológico y a las directrices de la ICS en: incontinencia de urgencia, incontinencia paradójica o por rebosamiento; incontinencia de estrés o de esfuerzo e incontinencia por cuadros mixtos de urgencia y estrés (Abrams *et al.*, 2002).

La IU de urgencia es la pérdida involuntaria de orina acompañada o inmediatamente precedida de urgencia miccional. Por urgencia miccional se entiende la percepción por el paciente de un deseo miccional súbito, claro e intenso, difícil de demorar y con miedo al escape. La urgencia suele ser consecuencia de una contracción involuntaria del detrusor vesical durante la fase de llenado vesical, es decir por la hiperactivación colinérgica del detrusor, llevando así a escapes repentinos de orina, aumento de la frecuencia miccional, y en ocasiones nocturia (Abrams *et al.*, 2002). La IUU es la forma más habitual de IU en personas mayores de 75 años, sobre todo en varones (40%-80%). En la mujer, la prevalencia de IUU oscila entre el 11% y el 20%, siendo más frecuente en la mujer postmenopáusica (Hunskar *et al.*, 2004).

La IU paradójica o por rebosamiento, también llamada IU inconsciente o retención crónica de orina, es la IU que se aprecia en pacientes sin deseo miccional. La etiología suele ser una obstrucción infravesical con dilatación de las vías urinarias superiores (pelvis y cálices renales). El cuadro que acompaña a la IU es la denominada nefropatía obstructiva, en la que la presión dentro del sistema calicial se iguala a la presión tubular o incluso a la presión del filtrado glomerular, lo que ocasiona una disfunción renal en su capacidad de concentración y acidificación urinaria. Esta circunstancia suele darse en casos de obstrucción del flujo de salida por la Hiperplasia Benigna de la Próstata (HBP) o por el cáncer de próstata. Su tratamiento contempla la

aplicación de presión en la musculatura inguinal (*maniobra de Credé*) y el autosondaje para favorecer el vaciamiento total de la vejiga (Bedoya-Ronga & Currie, 2014).

La IU de estrés se define como la pérdida involuntaria de orina que se asocia al esfuerzo físico. El ejercicio provoca un aumento de la presión abdominal (como sucede durante la tos y el estornudo) y, como consecuencia, se produce un incremento de la presión intravesical, que cuando supera la presión del esfínter uretral da lugar a escapes continuados de orina. Se han descrito tres cuadros de IUE: Tipo I, II y III. El Tipo I y II son producidas por las alteraciones anatómicas en la base de la vejiga, concretamente por la pérdida del ángulo uretrovesical posterior, siendo característica, además, en el Tipo II la caída de la vejiga y de la uretra. Las IU de estrés Tipo III se producen por disfuncionalidad del mecanismo esfintérico intrínseco que origina un cuello de vejiga urinaria abierto de forma permanente. Dicha patología afecta primordialmente a la población femenina constituyendo la forma más grave de incontinencia urinaria, la de mayor frecuencia de presentación en postoperatorios de intervenciones quirúrgicas retropúbicas (cirugías ginecológicas) y también en varones tras cirugías prostáticas, con terapias farmacológicas de escasa eficacia en las que se utilizan esencialmente agonistas de los receptores adrenérgicos α_1 e inhibidores de la recaptación de 5-HT (duloxetina) para producir contracción de la base de la vejiga urinaria) (Li *et al.*, 2013; Robinson & Cardozowan, 2014).

En la década de los 90, se describían los síntomas del Tracto Urinario Inferior (STUI) como *prostatismo o síndrome prostático*. En 1994, Abrams utilizó el término LUTS, que proviene del término anglosajón "*Lower Urinary Tract Symptoms*", para describir y clasificar una serie de síntomas frecuentes en el varón que se manifiestan y se relacionan con distintas patologías del Tracto Urinario Inferior. En 2011, expertos de la *5ª International Consultation on Benign Prostatic Hyperplasia* recomendó la utilización del término STUI. Los STUI se dividen en tres grupos: síntomas de llenado (urgencia miccional, nocturia, polaquiuria diurna, dolor suprapúbico), síntomas de vaciado (dificultad de inicio miccional, disminución del calibre y fuerza del chorro miccional, micción intermitente y prolongada, retención de orina) y síntomas postmiccionales (sensación de vaciado incompleto y goteo posmiccional) (Yoshimura *et al.*, 2014). Los STUI están asociados fundamentalmente, con el desarrollo de la HBP, característica en hombres de avanzada edad, lo cual, condiciona en gran medida su calidad de vida. Un estudio en varones con edades comprendidas entre 60-70 años, indicaba que un 47% de

ellos sufrían de STUI, el cual, estaba relacionado con el envejecimiento, la enfermedad cardiovascular, la diabetes mellitus y la depresión (Yoshimura *et al.*, 2014).

El tratamiento farmacológico con antagonistas adrenérgicos α_1 e inhibidores de la 5 α -reductasa, enzima que favorece el paso de testosterona a su metabolito activo 4,5- α -dihidrotestosterona, es resolutivo por producir la relajación de la musculatura lisa del cuello de la vejiga y la uretra y reducir el volumen de la próstata, respectivamente, siendo además, la terapia farmacológica de elección en la HBP asociada con la hiperactividad vesical (Chung & Kaplan, 2010). El uso de los inhibidores de la PDE5, frecuentemente utilizados para el tratamiento de la disfunción eréctil, son también de gran eficacia en el tratamiento del STUI por producir relajación del músculo liso de la región de salida de orina (Vishwajit & Anderson, 2009).

El conocimiento de la naturaleza de los transmisores y/o moduladores, así como de los mecanismos involucrados en la tensión del músculo liso del uréter intravesical y del cuello de la vejiga urinaria es esencial en aras a desarrollar una correcta intervención terapéutica en los cuadros de RVU, patologías obstructivas ureterales, IU de estrés tipo III y en los STUI.

En relación a la regulación del SNA, diferentes mediadores inhibidores NANC, como el NO, el VIP y el ATP han sido propuestos como responsables de la regulación nerviosa sobre la tensión de la musculatura lisa del uréter intravesical y del cuello vesical (Andersson & Arner, 2004; Kanai & Andersson, 2010). De hecho, el NO, es el principal neurotransmisor inhibidor del uréter intravesical, produciendo relajación de la musculatura lisa a través de mecanismos dependientes de la guanilato ciclasa soluble involucrando la activación de canales K_{ATP} del plasmolema (Hernández *et al.*, 1995; Hernández *et al.*, 1997). En el cuello de la vejiga, el NO, cuya liberación desde nervios intramurales es modulada por canales K_V y receptores adrenérgicos α_2 , de localización presináptica, desempeña un papel clave en la transmisión inhibidora produciendo relajación de la musculatura lisa a través de mecanismos neuronales y no neuronales (Hernández *et al.*, 2007; Hernández *et al.*, 2008). El ATP, la 5-HT y péptidos, como el VIP y el PACAP, desempeñan, asimismo, un papel crucial en la transmisión inhibidora del cuello vesical. El ATP produce relajación del cuello vesical a través de los receptores purinérgicos $P2Y_1$ y A_{2A} después de la hidrólisis del ATP a ADP y adenosina, respectivamente (Hernández *et al.*, 2009), mientras que la 5-HT, cuyo efecto es modulado por los receptores 5-HT $_{1A}$ presinápticos, produce la relajación vía receptores musculares 5-HT $_7$, acoplados a la vía de la PKA, sin involucrar activación de

los canales de K^+ de membrana (Recio *et al.*, 2009). El PACAP y el VIP producen relajación del cuello de la vejiga urinaria del cerdo a través de receptores musculares del subtipo $VPAC_2$, acoplados a la vía de la PKA, y de los receptores PAC_1 localizados en las aferentes sensoriales sensibles a la capsaicina (APSC) y acoplados a la liberación del NO, y de los receptores VPAC inhibidores situados en las terminaciones nerviosas motoras (Hernández *et al.*, 2006a). La BK produce contracción del uréter intravesical del cerdo a través de la activación de receptores B_2 , presentes en el músculo liso, acoplados principalmente a la entrada del Ca^{2+} extracelular vía canales VOC tipo L. Asimismo, receptores B_2 , localizados en las terminaciones nerviosas motoras, estimulan la neurotransmisión inhibitoria NANC ureteral dependiente e independiente del NO (Ribeiro *et al.*, 2014a). En el cuello de la vejiga del cerdo, la BK induce un efecto dual sobre la tensión de la musculatura lisa. Así, la BK origina un efecto contráctil mediado a través de la activación de receptores B_2 , acoplados esencialmente a la entrada de Ca^{2+} extracelular vía canales VOC tipo L. Sin embargo, en muestras previamente contraídas, el agonista selectivo de los receptores B_1 , calidina, promueve la relajación del cuello vesical vía receptores bradicinérgicos, localizados en el urotelio, a través de mecanismos dependientes de la activación de la COX-1 y de canales BK_{Ca} . Además, se demostró la existencia de receptores B_2 presinápticos facilitadores de la neurotransmisión inhibitoria del cuello vesical mediada por el NO y el H_2S (Ribeiro *et al.*, 2014b). En el cuello de la vejiga urinaria del cerdo y del hombre, el inhibidor selectivo de la PDE 4, rolipram, promueve una relajación muy potente. En el cerdo, la relajación inducida por el rolipram es producida a través de la vía de la PKA involucrando la activación de canales BK_{Ca} e IK_{Ca} , así como, mecanismos dependientes de la desensibilización al Ca^{2+} . Dicho efecto es, asimismo, producido vía liberación del NO y el H_2S desde los nervios intramurales del cuello vesical (Ribeiro *et al.*, 2014c).

El H_2S es considerado el tercer gas neurotransmisor junto con el NO y el CO y desempeña una amplia variedad de acciones biológicas en condiciones fisiológicas y fisiopatológicas (Wang, 2012). El H_2S produce relajación del músculo liso vía de forma directa y/o indirecta e inhibe las contracciones por actividad peristáltica o inducidas por la estimulación eléctrica transmural (EET) (Teague *et al.*, 2002). En la vejiga urinaria de rata, los donantes de H_2S producen la contracción del detrusor por mecanismos indirectos a través de la estimulación de aferentes sensoriales (Patacchini *et al.*, 2004, 2005).

A pesar del papel clave desempeñado por el H₂S en la regulación de la tensión del detrusor, no existe información referida a su acción en el uréter intravesical y en el cuello de la vejiga urinaria. Por todo lo expuesto, el presente estudio tiene como objetivo general investigar la acción del H₂S en la regulación de la tensión de la musculatura lisa del uréter intravesical, componente ureteral de la unión uréterovesical, y del cuello vesical del cerdo, cuyo Tracto Urinario es similar al del hombre, en aras a proporcionar terapias farmacológicas efectivas en patologías de las vías urinarias como son el RVU, la obstrucción ureteral por enclavamiento de cálculos, la IU de estrés producida por deficiencia esfintérica intrínseca y el cuadro sintomatológico del Tracto Urinario Inferior secundario a la HBP. Así, utilizando diferentes abordajes experimentales (inmunohistoquímica, *Western Blot*, determinación de la producción endógena de H₂S, registro de fuerza isométrica y medida simultánea de Ca²⁺ intracelular y tensión isométrica, se ha estudiado:

1. El papel del H₂S en la neurotransmisión inhibitoria del uréter intravesical.

Para ello se ha investigado la expresión de las enzimas de síntesis de H₂S, CSE y CBS, la producción endógena de H₂S, la relajación inducida como consecuencia de su liberación desde terminaciones nerviosas intramurales en respuesta a la EET y por la estimulación con el donante de H₂S de nueva síntesis, GYY4137, y los mecanismos responsables de dicha respuesta.

2. El papel del H₂S en la neurotransmisión inhibitoria del cuello de la vejiga urinaria. Para ello se ha estudiado la expresión de las enzimas CSE y CBS, los mecanismos implicados en la relajación inducida por la EET y por el donante GYY4137, y la medida simultánea de [Ca²⁺] intracelular y tensión isométrica.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. MATERIAL BIOLÓGICO

Se han utilizado vejigas de cerdos sanos adultos, de ambos sexos, sin alteraciones significativas en su Tracto Urinario, obtenidas en el Matadero Madrid Norte, S.A. Las vejigas fueron extraídas inmediatamente después del sacrificio de los animales y cuidadosamente introducidas en termos conteniendo una solución salina fisiológica (SSF) a 4° C, siendo posteriormente transportadas hasta el Laboratorio del Músculo Liso del Departamento de Fisiología de la Facultad de Farmacia de la UCM.

En nuestro laboratorio, las vejigas fueron colocadas en placas de Petri con SSF a 4° C (Figura XI), y se procedió a la eliminación del tejido adiposo y conjuntivo circundante. Se realizó una incisión longitudinal desde la uretra hasta la inserción del ligamento umbilical en el cuerpo de la vejiga. Para la obtención de las preparaciones de uréter intravesical se procedió a la separación del uréter de la pared de la vejiga internamente desde los orificios ureterales. Las muestras de cuello vesical se obtuvieron por microdissección de la musculatura lisa localizada por debajo del trigono y 4 a 5 mm por encima de la uretra proximal. Se disecaron tiras longitudinales de uréter intravesical y del cuello vesical de 4-6 mm de largo por 2-3 mm de ancho.

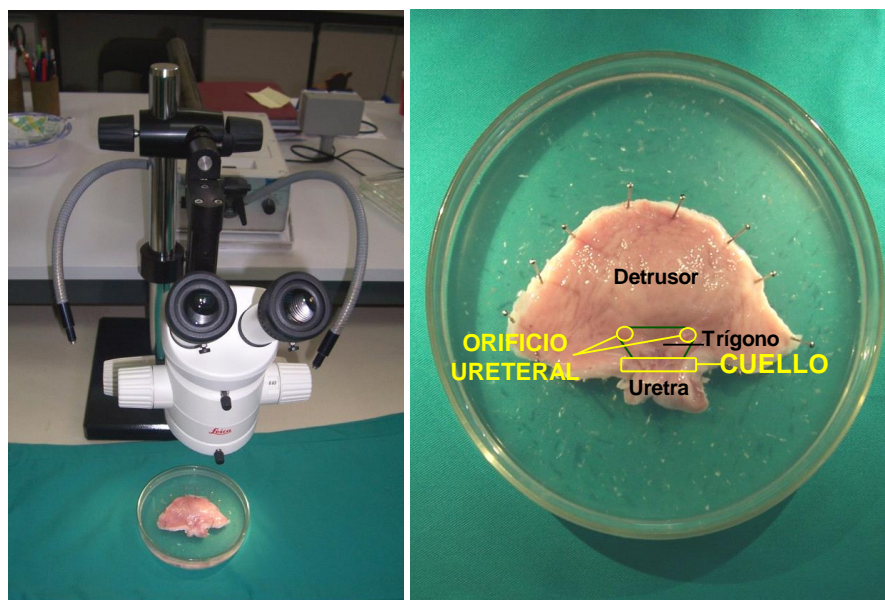


Figura XI. Identificación del uréter intravesical y cuello vesical para su microdissección. Vejiga urinaria de cerdo en placa de Petri con SSF a 4°C bajo un microscopio Leica Diaplan y una fuente de luz fría Leica.

2. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Inmunohistoquímica

En el estudio inmunohistoquímico para la identificación de las enzimas de síntesis de H₂S, CSE y CBS, se utilizó un método de doble marcaje con la proteína PGP 9.5, marcador específico de nervios, mediante con fluorescencia. Las preparaciones del uréter intravesical y del cuello de la vejiga fueron fijadas en paraformaldehído al 4 % en una solución tampón fosfato (PB) 0.1 M y pH 7.4 y finalmente fueron sumergidas en una solución de sacarosa al 30% en PB para su crioprotección. A continuación, el tejido fue congelado y almacenado en una solución OCT (*Tissu-Tek®*, *Sakura Finetek Europe B.V.*) a -80°C.

Posteriormente se obtuvieron secciones transversales de 5 µm de espesor con ayuda de un micrótopo de congelación. La reacción se inició con una preincubación de dichas secciones durante 3 h a temperatura ambiente y con agitación suave, en una solución de suero normal de cabra (NGS) al 10% y 0.3% de Tritón X-100 en PB. Transcurrido dicho periodo, se realizó la incubación con PB conteniendo un anticuerpo primario específico conejo anti-CSE (diluido 1:50, *Aviva Systems Biology*, San Diego, USA), anti-CBS (diluido 1:50, *Aviva Systems Biology*, San Diego, USA) y ratón anti-PGP 9.5 (marcador neuronal, diluido a 1:50, *Abcam*, Cambridge, UK). Los anticuerpos fueron diluidos en una solución de bloqueo al 2% de NGS o NDS y 0.3% de TX-100 en PB. Los anticuerpos fueron seleccionados teniendo en cuenta que sus correspondientes secundarios pertenecieran a distintas especies y tuvieran distintos espectros de emisión. A continuación, se realizaron tres lavados de 10 min a temperatura ambiente en PB, para eliminar el exceso de anticuerpo primario, y se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario conjugado con fluoresceína (*Alexa Fluor® 594 cabra-anti conejo*, *Invitrogen*, Paisley, UK, diluido a 1:200, fluoruro rojo para CSE y CBS, y *Alexa Fluor® 488 cabra-anti ratón*, *Invitrogen*, Paisley, UK, diluido a 1:200, fluoruro verde para PGP 9.5) de forma conjunta como los anticuerpos primarios, en cámara húmeda durante 2 h a temperatura ambiente. Luego los cortes fueron lavados en PB para remover el exceso de anticuerpo secundario y se cubrieron con *Prolong® Gold antifade reagent* con DAPI (*Invitrogen*, Paisley, UK). Por último, se procedió a la observación de las preparaciones al microscopio, en cámara oscura, aplicando filtros de diferentes

longitudes de onda para visualizar los distintos anticuerpos y fueron fotografiadas gracias a un sistema de cámara adaptada al microscopio.

Western blot

Preparaciones del uréter intravesical fueron homogenizadas manualmente en alícuotas *Eppendorf*® donde fue recogida la muestra, manteniéndola sumergida en N₂ líquido durante el proceso de fricción mecánica, con una torunda de plástico, hasta convertirla en polvo. Posteriormente se adicionó individualmente a cada muestra un tampón de lisis conteniendo Tris-HCl 10 mM (pH= 7.4), sulfato sódico de dodecilo (SDS) al 1% y vanadato sódico 1 mM, tampón SDS de lisis (75 µl), moliendo hasta su perfecta homogenización. A continuación, se centrifugaron las muestras a 14000 g a 4°C durante 20 min, recogiendo el líquido sobrenadante con todas las proteínas de membrana y citosólicas solubilizadas. Las muestras (50 mg de proteína) se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 15% y posteriormente fueron transferidas a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF) que se bloquearon con suero total o leche en polvo desnatada al 5% durante 1 h a temperatura ambiente.

Tras el bloqueo se procedió a la incubación con el anticuerpo primario específico conejo anti-CSE y anti-CBS (dilución 1:1000, *Aviva Systems Biology*, San Diego, USA), y ratón anti-β actina (dilución 1:20000, *Santa Cruz Biotechnology*, Heidelberg, Germany) disueltos en solución BSA al 5%. La membrana se mantuvo expuesta al anticuerpo primario durante toda la noche a 40°C y con agitación lenta. Para eliminar el anticuerpo primario no unido a proteínas, se realizaron 3 lavados con TBS-T 1X de 10 min cada uno y con agitación rápida. A continuación, se expusieron las membranas al anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano (HRP), (*Alexa Fluor 594* cabra-anticonejo, dilución 1:200, *Invitrogen*, Paisley, UK) para detectar las enzimas CSE y CBS, manteniéndolo durante 1 h a temperatura ambiente y con agitación lenta. El exceso de anticuerpo secundario se eliminó mediante 3 lavados con TBS-T 1X de 10 min cada uno y con agitación rápida.

El revelado de las proteínas se realizó añadiendo sobre la membrana las soluciones del kit *ECL* (*Amersham Biosciences, Europe GMBH*), el cual, contiene luminol, sustrato quimioluminiscente, que reacciona con la HRP en presencia de peróxido de hidrógeno. Inmediatamente después de su oxidación, el luminol se encuentra en un estado excitado emitiendo luz. La cantidad de luminiscencia obtenida es proporcional

al anticuerpo secundario, que se une al anticuerpo primario que, a su vez, se une específicamente a la proteína. La cuantificación de la señal quimioluminiscente se realizó mediante análisis densitométrico de las membranas comparando el valor de las proteínas de interés con la señal obtenida de la β -actina, que es utilizada como control de carga. El análisis densitométrico del *Western blot* se realizó con el equipo *Imagequant LAS 500* y el software informático *ImageQuant TL* (GE Healthcare Europe GMBH).

Medida endógena de H₂S

La producción endógena de H₂S se midió en preparaciones del uréter intravesical siguiendo el método descrito en el colon de rata (Gil *et al.*, 2011). La muestra se colocó en un vial de polipropileno en SSF con los siguientes tratamientos: 10 mM de L-cisteína, 2 mM de piridoxal 5'-fosfato, 100 mM de tampón de fosfato de potasio (pH 7,4), en ausencia o en presencia de L- NOARG (100 μ M), PPG (1 mM) y GYY4137 (10 μ M), inhibidores de sintasa de NO, de la CSE y donante de H₂S, respectivamente. A su vez, este vial se conectó a un segundo vial de 2 ml con 0.5 ml de acetato de zinc al 1%. El primer vial fue aireado continuamente con carbógeno. La reacción se inició mediante la transferencia de los viales que estaban sumergidos en hielo a un baño de agua a 37° C. El H₂S producido en el vial de incubación se liberó hasta el segundo vial donde se quedó atrapado través de la solución de acetato de zinc como sulfuro de zinc. Se detuvo la reacción a los 30 min mediante la adición de 0.5 ml de ácido tricloroacético al 50% (*w/v*) al vial de incubación. Se mantuvo el burbujeo con carbógeno durante un periodo de 30 min para asegurar la captura completa de H₂S en la solución de acetato de zinc. El contenido del segundo vial se transfirió a tubos de ensayo que contenían 3.5 ml de agua desionizada, 0.4 ml de N, Ndimetil sulfato de p-fenilendiamina (20 mM) en HCl (7,2 M) y 0,4 ml de FeCl₃ (30 mM) en HCl (1,2 M), para realizar el test del azul de metileno. A los 20 min, se midió la absorbancia de la solución resultante a 670 nM por espectrofotometría (lector de microplacas *ELx800*, *Izasa*). La concentración de H₂S se calculó frente a una curva de calibración de una solución estándar de NaHS.

Estudios funcionales

Las tiras longitudinales de 4-6 mm de largo y 2-3 mm de ancho de músculo liso del uréter intravesical y cuello vesical fueron montadas en un miógrafo 820MS DMT

(DMT, Aarhus, Dinamarca) con 4 baños de órganos aislados de 6 ml de capacidad conteniendo SSF a 37° C y aireada con carbógeno (95% O₂ y 5% CO₂) para obtener un pH final de 7.4. Uno de los extremos de la preparación se conectó a un transductor de fuerza isométrica, que recoge continuamente los cambios de tensión y los transforma en señales eléctricas, mientras que el otro extremo, se fijó a un tornillo micrométrico que permite aplicar tensión activa a las preparaciones (Figura XII). Tras un periodo de estabilización de 30 min, se procedió al estiramiento de las preparaciones de músculo liso, durante un periodo de normalización de 1 h, hasta la obtención de una tensión pasiva de 1.5 g.

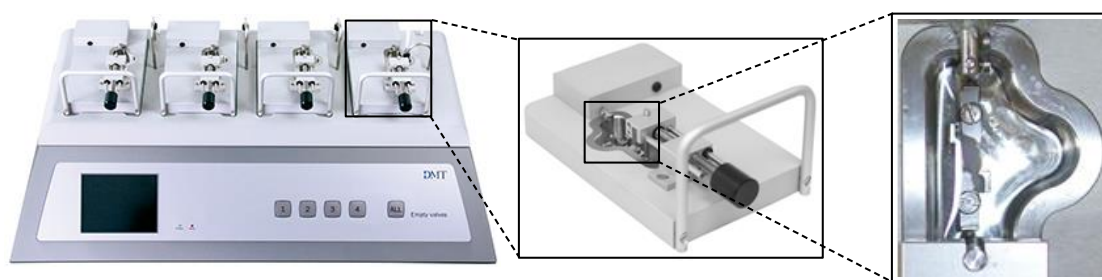


Figura XII. Miógrafo 820MS DMT. Miógrafo para registro de la fuerza isométrica con 4 baños de órganos y detalle del montaje de una preparación longitudinal de músculo liso.

Los experimentos fueron realizados en el mismo día y al día siguiente del sacrificio de los animales, ya que se ha comprobado que la reactividad de las preparaciones de músculo liso no se veía comprometida pasadas 24 h, siempre y cuando y cuando sean mantenidas en SSF a 4°C.

Una vez montadas y normalizadas las muestras, se valoró su capacidad contráctil mediante su exposición a una SSF rica en K⁺ (124 mM) (SSF-K). Posteriormente, se realizaron tres lavados con SSF y una vez estabilizadas las muestras, se procedió a la realización de los diferentes protocolos experimentales.

En los experimentos de EET, las muestras fueron incubadas con guanetidina (10 µM), atropina (0.1 µM) y/o N^G-nitro-L-arginina (L-NOARG, 100 µM), inhibidor de la neurotransmisión adrenérgica, antagonista de los receptores muscarínicos e bloqueante de la sintasa de NO, respectivamente, durante 1 h, reemplazando la SSF cada 20 min, estando presentes dichos tratamientos durante el desarrollo del experimento. En preparaciones precontraídas con fenilefrina (FE, 1 µM) en el cuello vesical o con el análogo del tromboxano (U46619, 0.1 µM) en el uréter intravesical, la EET fue llevada a

cabo mediante pulsos rectangulares (de un 1 ms de duración, en un rango de frecuencias entre 0.5 y 16 Hz, trenes de 20 s, con la corriente de salida constante ajustada a 75 mA), con intervalos de 4 min mediante un estimulador *Cibertec CS20* (Barcelona, España). Se realizó una primera curva frecuencia- o dosis-respuesta de relajación inducida por la EET o por el donante de H₂S, P-(4-methoxyphenyl)-P-4-morpholinylphosphinodithioic acid, en dosis semilogarítmicas crecientes (GY4137, 0.1 nM- 30 mM en el uréter intravesical y 0.1nM- 10 µM en el cuello vesical). A continuación, la SSF fue renovada cada 15 min durante un período total de 90 min. Posteriormente se procedió a la incubación con los tratamientos específicos durante un periodo de 30 min y a continuación se realizó la segunda curva de relajación inducida por la EET y por el GY4137.

Para la desensibilización de las APSC, las preparaciones fueron preincubadas con capsaicina (10 µM) durante 1 h, reemplazando la SSF cada 20 min y manteniendo dicho tratamiento durante el desarrollo del experimento.

Medida simultánea de tensión y Ca²⁺ intracelular

Para la medida simultánea de tensión y Ca²⁺ intracelular se montaron y normalizaron preparaciones de músculo liso del cuello vesical en un miógrafo simple. Posteriormente, se incubaron las preparaciones con *fura-2 AM* (8 µM) y 0.05% Cremophor EL, durante 120 min a 37°C en oscuridad, lavando la preparación 3 veces con SSF durante 60 min y reemplazando el *Fura-2 AM* (8 µM) y *Cremophor EL* (0.05%) (Villalba *et al.*, 2007; Fernandes *et al.*, 2012). El miógrafo se colocó sobre la pletina de un microscopio invertido *Zeiss Axiovert S100*, donde se hizo incidir un haz de luz sobre la preparación, alternando dos longitudes de onda diferentes, 340 y 380 nm a una frecuencia de 10 Hz. La selección de estas longitudes de onda corresponde a los máximos de los registros de fluorescencia de soluciones de *Fura-2* saturadas de Ca²⁺ (340 nm) y de *Fura-2* libre de Ca²⁺ (380 nm). La luz fluorescente emitida por el *Fura-2* atraviesa el espejo dicróico y es conducida al fotomultiplicador pasando a través de un filtro interferencial de paso de banda centrado en 510 nm. La fluorescencia de emisión a las dos longitudes de onda (F₃₄₀ y F₃₈₀) y la fuerza (mN) se registraron simultáneamente mediante el *software Felix* (*Photon Technology International, USA*) (Figura XIII). Los valores de R_{min}, R_{max} y F_{380-max} y F_{380-min}, se determinaron mediante un método que compromete la viabilidad de la preparación y que, por lo tanto, se realiza

al final de cada protocolo experimental. Las condiciones de Ca^{2+} mínimas y de saturación se realizaron mediante la incubación de la preparación con el ionóforo ionomicina en una solución con EGTA (K^+ -Hepes⁰) y con una solución rica en Ca^{2+} (K^+ -Hepes⁵), respectivamente. Finalmente, la contribución de la fluorescencia no específica se determinó mediante “*quenching*” del *Fura-2* con Mn^{2+} cuyos valores obtenidos fueron sustraídos de todas las medidas obtenidas durante el experimento.

Las preparaciones de músculo liso de cuello vesical fueron inicialmente estimuladas con una SSF-K para comprobar su viabilidad funcional, así como, de la entrada de Ca^{2+} al citosol por la activación de canales VOC tipo L mediante la despolarización de la membrana. Posteriormente, se lavaron 3 veces con SSF normal y se dejó estabilizar antes de empezar el protocolo experimental. Las preparaciones fueron precontraídas con FE (1 μM) para obtener un tono sostenido e incrementar las concentraciones de Ca^{2+} intracelulares y sobre el cual, se realizaron curvas dosis-respuesta en concentraciones crecientes de GYY4137 (1 nM, 100 nM y 10 μM).

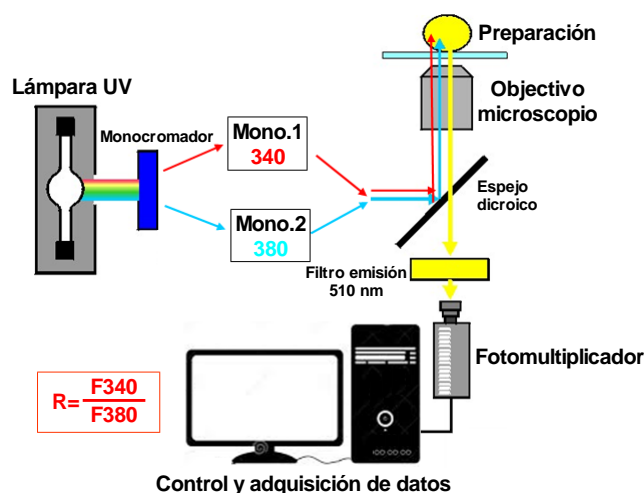


Figura XIII. Esquema representativo del sistema de microfluorimetría. La haz de luz proveniente de la lámpara UV, pasa por un monocromador con filtros alternos para dos longitudes a 340 y 380 nm y llegan al microscopio a través de una guía líquida, se refleja en un espejo dicróico (>430 nm) y alcanza la preparación a través del objetivo del microscopio. La luz fluorescente emitida por el fura-2 intracelular es capturada por el objetivo, atraviesa el espejo y dirigiéndose hasta el filtro de emisión centrado a 510 nm hasta el fotómetro. La señal emitida por la preparación, debido a la excitación de la misma a 340 nm (fura-2 unido a Ca^{2+}) y 380 nm (*Fura-2* libre) es recogida a 510 nm y permite calcular el ratio, $R = F_{340}/F_{380}$, como indicador del Ca^{2+} intracelular.

Drogas y soluciones

Para la realización del protocolo experimental, se han utilizado las siguientes drogas:

- Ácido p-(4-metoxifenil)-P-4-morfolinilfosfineditiico (GYY4137), donante de H₂S (*Tocris*, Reino Unido).
- L-cisteína, precursor de la síntesis de H₂S (*Sigma*, Estados Unidos).
- DL-propargilglicina (PPG), inhibidor de la CSE (*Sigma*, Estados Unidos).
- O-(carboximetil) hidroxilamina (AOAA), inhibidor de la CBS (*Sigma*, Estados Unidos).
- Fenilefrina (FE), agonista de los receptores adrenérgicos α_1 (*Sigma*, Estados Unidos).
- 9,11-dideoxi-9a,11a-metanoepoxi prostaglandina F_{2 α} (U46619), análogo del tromboxano (*Tocris*, Reino Unido).
- 2-(1,3-dimetil-2,6-dioxo-1,2,3,6-tetraidro-7H-purina-7-yl)-N-(4-isopropil fenil) acetamida (HC030031), inhibidor de los canales TRPA₁ (*Tocris*, Reino Unido).
- (2E)-N-(2, 3-diidro-1, 4-benzodioxina-6-il)-3-[4-(1,1-dimetiletil)fenil]-2-propenamida (AMG9810), inhibidor de los canales TRPV₁ (*Sigma*, Estados Unidos).
- Péptido relacionado con el gen de la calcitonina 8-37 (CGRP₈₋₃₇), antagonista de los receptores CGRP (*Tocris*, Reino Unido).
- Polipéptido activador de la adenilato cíclica pituitaria 6-38 (PACAP₆₋₃₈), antagonista de los receptores PACAP (*Tocris*, Reino Unido).
- Capsaicina, neurotoxina de las APSC (*Tocris*, Reino Unido).
- Tetrodotoxina (TTX), inhibidor de canales Na⁺ neuronales dependientes de voltaje (*Sigma*, Estados Unidos).
- Atropina, antagonista de los receptores muscarínicos (*Sigma*, Estados Unidos).
- Guanetidina, neurotoxina noradrenérgica (*Sigma*, Estados Unidos).
- Indometacina, inhibidor de la COX (*Sigma*, Estados Unidos).
- 5-(4-clorofenil)-1-(4-metoxifenil)-3-(trifluorometil)-1H-pirazol (SC560), inhibidor selectivo de la COX-1 (*Tocris*, Reino Unido).
- N-[2-ciclohexiloxil-4-nitrofenil] metanosulfonamida (NS398), inhibidor selectivo de la COX-2 (*Tocris*, Reino Unido).

- N^G-nitro-L-Arginina (L-NOARG), inhibidor de la sintasa de NO (*Sigma*, Estados Unidos).
- 1H-[1,2,4]oxadiazolo [4,3-a] quinoxalina-1-ona (ODQ), inhibidor de la guanilato ciclasa soluble (*Tocris*, Reino Unido).
- Nifedipina, bloqueante de los canales VOC tipo L (*Sigma*, Estados Unidos).
- Iberitoxina (IbTX), bloqueante de los canales BK_{Ca} (*Tocris*, Reino Unido).
- 1-[(2-Chlorophenyl)diphenylmethyl]-1H-pyrazole (TRAM 34), bloqueante de los canales IK_{Ca} (*Tocris*, Reino Unido).
- Apamina, bloqueante de los canales SK_{Ca} (*Sigma*, Estados Unidos).
- Glibenclamida, bloqueante de los canales K_{ATP} (*Tocris*, Reino Unido).
- 4-aminopiridina (4-AP), bloqueante de los canales K_V (*Sigma*, Estados Unidos).
- (9R,10S,12S)-2,3,9,10,11,12-hexahydro-10-hydroxy-9-methyl-1-oxo-9,12-epoxy-1H-di indolo[1,2,3-fg:3',2',1'-kl]pyrrolo[3,4-[1,6]benzodiazocine-10-carboxylic acid (KT 5720), inhibidor de la PKA (*Tocris*, Reino Unido).
- Piridoxal 5'-fosfato, cofactor enzimático en las reacciones de transaminación (*Sigma*, Estados Unidos).
- Acetato de zinc, intercambiador iónico en procesos catalíticos (*Sigma*, Estados Unidos).
- Ácido tricloroacético, utilizado para la determinación la concentración de proteína por precipitación cuantitativa (*Sigma*, Estados Unidos).
- Sulfato N,N-dimetil-p-fenilendiamina, producto intermedio para colorantes (*Sigma*, Estados Unidos).
- Acido Clorhídrico (HCl) (*Sigma*, Estados Unidos).
- Cloruro de hierro (FeCl₃) (*Sigma*, Estados Unidos).

AMG9810, AOAA, CGRP₈₋₃₇, PPG, glibenclamida, GYY4137, HC030031, KT5720, ODQ, NS398, SC560, TRAMP 34 y PACAP₆₋₃₈ fueron disueltos en dimetilsulfoxido (DMSO). Indometacina y U46619 fueron disueltos en etanol al 96%. Las demás drogas usadas, fueron disueltas en H₂O bidestilada. Los solventes, a la concentración final, no excedieron el 0.1% del volumen total de los baños de órganos y no tuvieron efecto sobre la contractilidad de las preparaciones del uréter intravesical y del cuello vesical.

La composición de la SSF fue (en mM): NaCl 119, KCl 4.6, MgCl₂ 1.2, NaHCO₃ 24.9, glucosa 11, CaCl₂ 1.5, KH₂PO₄ 1.2, ácido etildiaminotetraacético (EDTA) 0.027.

La composición de la SSF-K es similar a la de la SSF, en la que se sustituye el NaCl por KCl en cantidades equimolares.

Análisis estadístico

La relajación inducida por el donante de H₂S, GYY4137, y la EET se expresa como porcentaje de la inhibición de la contracción inducida por la FE (1 μM) o el U46619 (0.1 μM) en las preparaciones de cuello y uréter intravesical, respectivamente. Para cada curva dosis-respuesta, la concentración necesaria para producir el 50% (EC₅₀) de la respuesta máxima (E_{max}) fue obtenida por análisis de regresión no lineal (*GraphPad Prism*, San Diego, CA). La sensibilidad y la máxima respuesta de los agonistas se expresó en valores de pD₂ y E_{max}, respectivamente, donde la pD₂ se define como el logaritmo negativo de la EC₅₀ (pD₂= -log EC₅₀).

Los resultados se expresan como media ± error estándar de la media (SEM) de *n* preparaciones de *N* animales. La evaluación estadística de las diferencias entre medias se ha realizado utilizando el test de la *t de Student* para observaciones pareadas. La evaluación de las diferencias significativas entre medias de diversos grupos se llevó a cabo mediante el análisis de varianza (ANOVA) seguido de un test de *Bonferroni*. Los valores fueron considerados significativamente diferentes con un nivel de probabilidad por debajo del 5% (*P*<0.05).

IV. RESULTADOS

1. PAPEL DEL H₂S EN LA NEUROTRANSMISIÓN INHIBIDORA DEL URÉTER INTRAVESICAL

1.1. EXPRESIÓN DE LAS ENZIMAS CSE Y CBS

El *western blot* reveló la presencia de una banda principal de aproximadamente 45 kDa que corresponde con el peso molecular esperado para la proteína CSE en la musculatura lisa del uréter intravesical (Figura 1 A) (n=4, N=4). Los estudios de inmunofluorescencia han mostrado la presencia de CSE, en fibras nerviosas ampliamente distribuidas por la capa muscular lisa del uréter intravesical y que discurren en paralelo a los haces de músculo liso (Figura 1 B-E) (n=5, N=5). Asimismo, se han identificado fibras inmunoreactivas positivas para la CSE en la proximidad de arteriolas que vascularizan la msuculatura lisa. La enzima CBS no fue detectada en la pared del uréter intravesical (Figura 1 F-J).

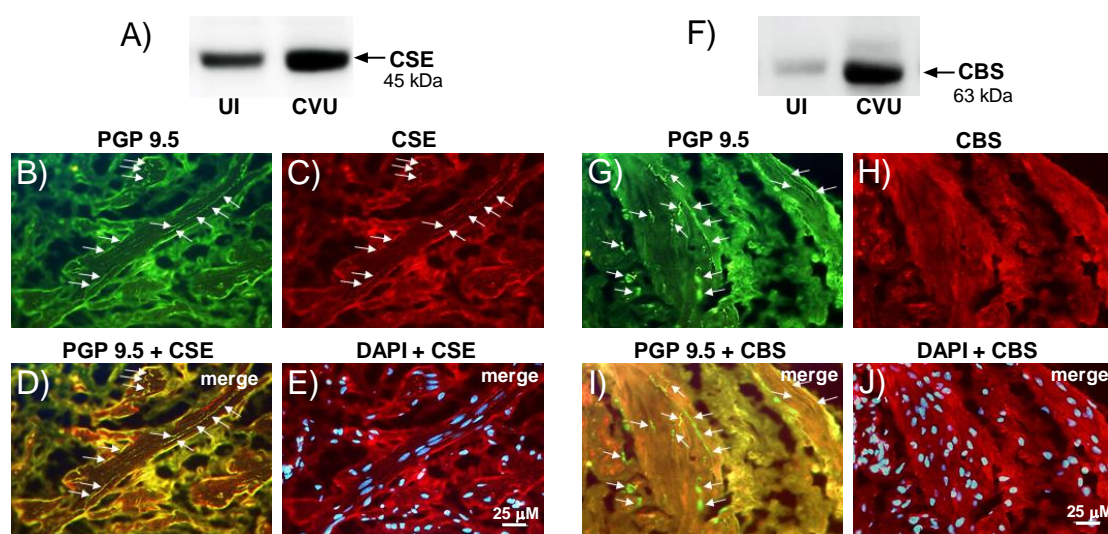


Figura 1. Expresión de la enzima CSE en secciones transversales de músculo liso del uréter intravesical. (A y F) *Western blot* de membranas de uréter intravesical (UI) y de cuello de la vejiga urinaria (CVU) (como control positivo) que muestran una banda a 43 kDa correspondiente al peso molecular de la CSE (A) y a 63 kDa, correspondiente con la banda de CBS. (B y G) Fibras nerviosas del uréter intravesical (color verde). (C) Fibras inmunoreactivas para CSE en el UI que discurren en paralelo a los haces de la musculatura lisa (color rojo). (D) Inmunofluorescencia de doble marcaje para PGP 9.5 y CSE que revelan la colocalización de la CSE en las terminaciones nerviosas (color amarillo). (E) Núcleos celulares marcados con DAPI (color azul). (G-J) Inmunofluorescencia de doble marcaje para PGP 9.5 y CBS que muestran la falta de expresión de la enzima CBS en el uréter intravesical.

1.2. ESTUDIOS FUNCIONALES

Tiras longitudinales del uréter intravesical, desprovistas de urotelio, fueron normalizadas durante un periodo de 60 min, hasta alcanzar una tensión pasiva de 1.5 ± 0.1 g (n=75, N=47). Las preparaciones fueron precontraídas con un análogo del tromboxano, U46619 ($0.1 \mu\text{M}$), el cual, indujo una contracción sostenida de 1.7 ± 0.1 g (n=75, N=47).

En condiciones NANC, la EET (0.5-16 Hz), produjo relajación dependiente de la frecuencia, siendo la máxima respuesta obtenida a una frecuencia de 16 Hz de ($75 \pm 7\%$ de inhibición de la contracción inducida por el U46619) (n=12, N=9). El donante de H_2S , GYY4137 ($0.1 \text{ nM} - 30 \mu\text{M}$), produjo una relajación dependiente de la concentración (pD_2 y Emax de 7.7 ± 0.1 y $81 \pm 7\%$) (n=12, N=9), la cual, no era modificada como consecuencia de la eliminación mecánica del urotelio.

1.2.1. Efecto del bloqueo de la CSE y CBS

Para investigar el papel fisiológico del H_2S en la neurotransmisión inhibitoria del uréter intravesical, las preparaciones fueron tratadas con PPG y AOAA, antagonistas de las enzimas de síntesis de H_2S , CSE y CBS, respectivamente. La PPG (1 mM), redujo el efecto relajante producido por la EET (Figura 2 A y B), mientras que, el AOAA (1 mM), no modificó dicha respuesta (Tabla 1). L-NOARG ($100 \mu\text{M}$), bloqueante de la sintasa de NO, disminuyó la relajación inducida por la EET (Figura 3 B). Asimismo, la incubación conjunta con PPG y L-NOARG, redujo drásticamente la relajación inducida por la EET (13% de la relajación control obtenida a 16 Hz). (Figura 3 A y B). La relajación inducida por el GYY4137 no era modificada por PPG (Figura 2 C), L-NOARG (Figura 3 C), PPG junto con L-NOARG (Figura 3 C) o AOAA (Tabla 2). Estos resultados, en conjunto, sugieren que el H_2S , sintetizado por acción de la CSE, participa junto con el NO en la neurotransmisión inhibitoria NANC del uréter intravesical.

Tabla 1. Efecto de la inhibición de la CBS, GCs, COX y PKA en la relajación inducida por la EET (0.5-16 Hz) en el uréter intravesical.

	<i>n</i>	EET (Hz)					
		0.5	1	2	4	8	16
Control	9	20±4	48±4	65±3	77±4	84±4	85±4
AOAA (1 mM)	9	24±4	53±4	69±3	78±2	85±3	85±3
Control	7	25±4	43±2	53±4	64±4	73±5	76±5
ODQ (5 µM)	7	4±2*	18±4*	27±6*	39±6*	52±5*	55±4*
Control	6	29±2	50±3	70±2	78±2	82±3	86±4
Indometacina (3 µM)	6	32±6	51±5	68±2	76±3	81±3	84±3
Control	6	19±3	42±4	65±3	76±3	81±3	82±2
KT5720 (3 µM)	6	18±4	39±5	63±3	75±3	79±3	79±3

Los resultados se expresan como porcentaje de la inhibición de la precontracción inducida por el análogo del tromboxano U46619 (0.1 µM) y representan la media±SEM de 6-9 preparaciones de 4-5 animales. * $P<0.05$, parámetro significativamente diferente con respecto a su valor control. Test de *t Student* para observaciones pareadas.

Tabla 2. Efecto de la inhibición de la CBS, GCs, COX y PKA en la relajación inducida por el donante de H₂S GYY4137 (0.1 nM - 30 µM) en el uréter intravesical.

	<i>n</i>	GYY4137	
		<i>pD2</i>	<i>E_{max}</i> (%)
Control	9	8.7±0.1	91±5
AOAA (1 mM)	9	8.6±0.1	88±5
Control	7	8.8±0.2	94±2
ODQ (5 µM)	7	8.8±0.1	92±3
Control	6	8.3±0.1	99±1
Indometacina (3 µM)	6	8.2±0.1	98±1
Control	6	8.4±0.2	98±1
KT5720 (3 µM)	6	8.4±0.1	98±1

Los resultados se expresan como porcentaje de la inhibición de la precontracción inducida por el análogo del tromboxano U46619 (0.1 µM) y representan la media±SEM de 6-9 preparaciones de 4-5 animales. * $P<0.05$, parámetro significativamente diferente con respecto a su valor control. Test de *t Student* para observaciones pareadas.

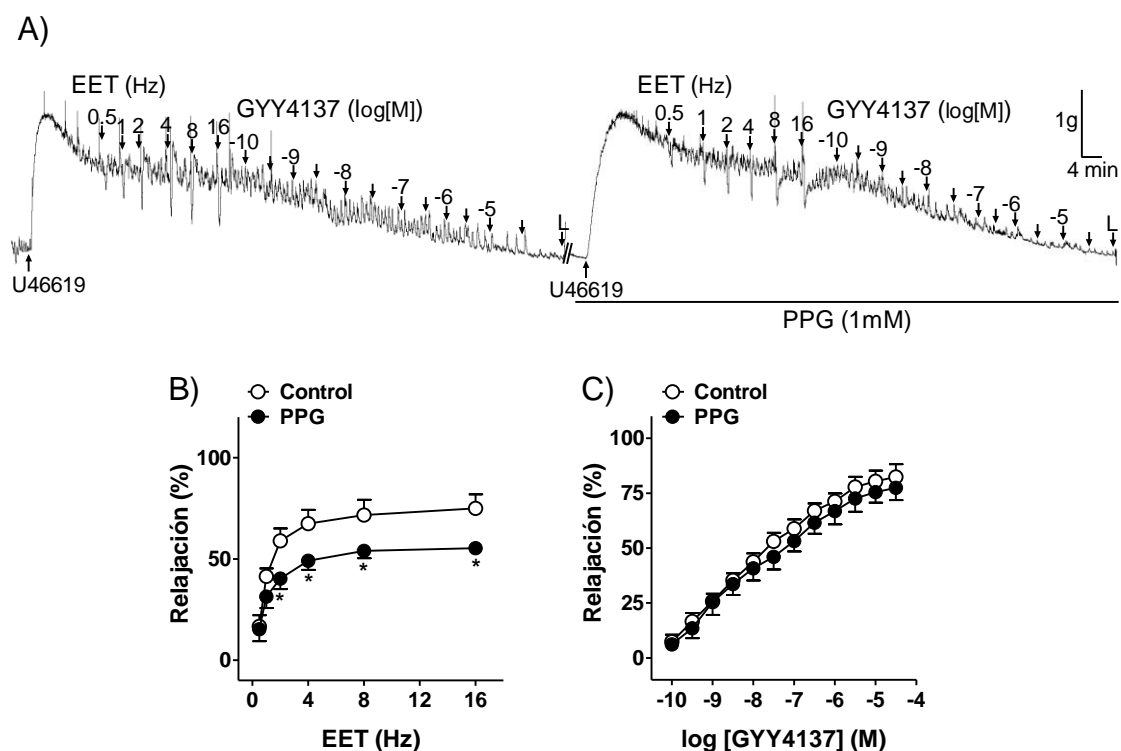


Figura 2. Efecto de la inhibición de la CSE en la relajación inducida por la EET y el GYY4137. (A) Registro de fuerza isométrica que muestra la relajación inducida por la EET (0.5-16 Hz) y GYY4137 (0.1 nM-30 μM) en ausencia y presencia de PPG (1 mM). (B-C) Curva de relajación inducida por la EET (B) y GYY4137 (C) en ausencia (círculos vacíos, control) y presencia (círculos llenos) de PPG. Los resultados se expresan como porcentaje de la inhibición de la precontracción inducida por el análogo U46619 (0.1 μM) y representan la media±SEM de 8 preparaciones de 4 animales. * $P < 0.05$, parámetro significativamente diferente con respecto a su valor control. Test de *t Student* para observaciones pareadas.

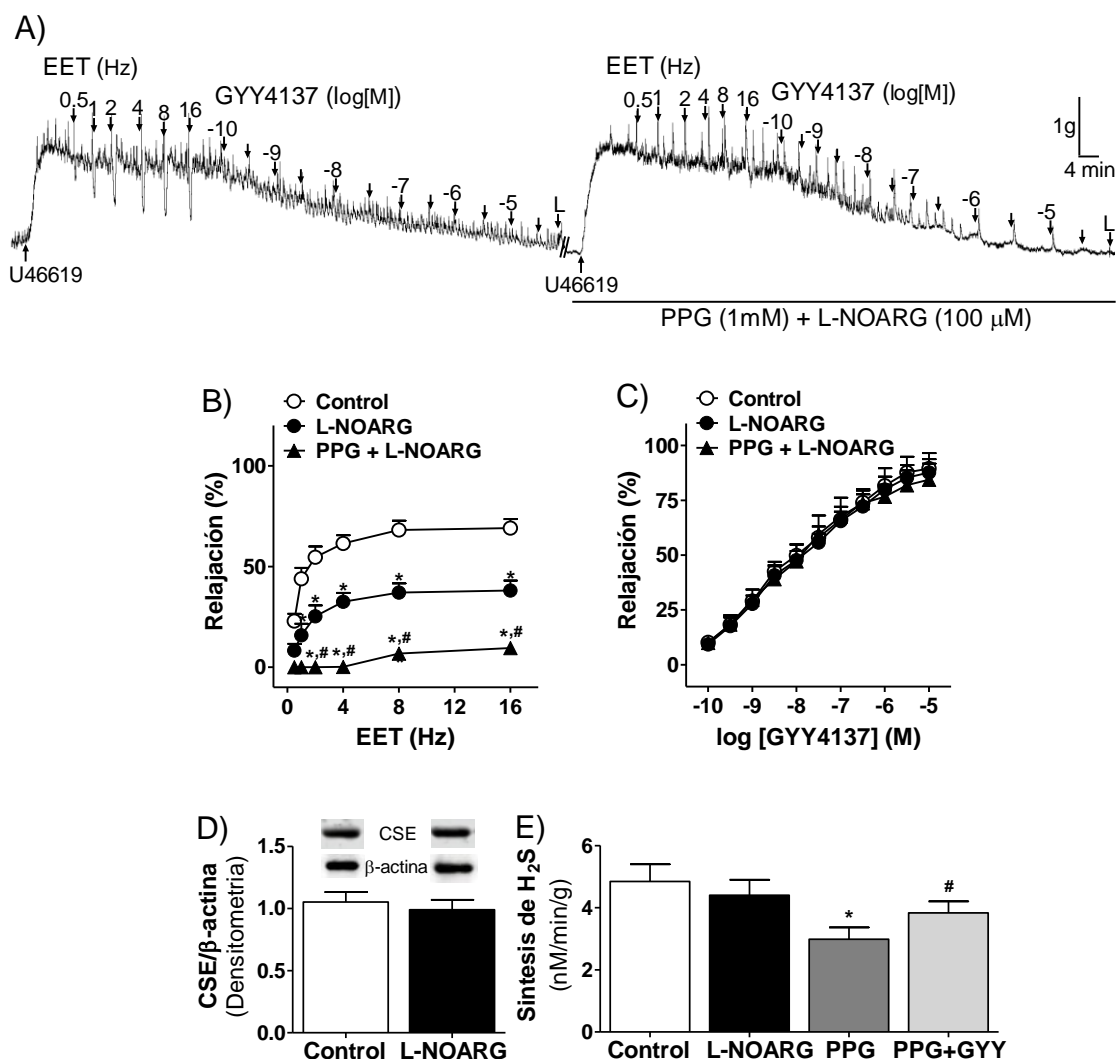


Figura 3. Efecto de la inhibición de la CSE y de la NOS en la relajación inducida por la EET y el GYY4137. (A) Registro de fuerza isométrica que muestra la relajación inducida por la EET (0.5-16 Hz) y el GYY4137 (0.1 nM-30 μM) en ausencia y presencia de PPG (1 mM) y L-NOARG (100 μM). (B-C) Curva de relajación inducida por EET (B) y GYY4137 (C) en ausencia (círculos vacíos, control) y presencia de L-NOARG (círculos llenos) y de PPG junto con L-NOARG (triángulos llenos). Los resultados se expresan como porcentaje de la inhibición de la precontracción inducida por el análogo U46619 (0.1 μM) y representan la media ± SEM de 7 preparaciones de 4 animales. *,# $P < 0.05$, parámetro significativamente diferente con respecto a su valor control. Análisis de varianza (ANOVA) seguido de un *test de Bonferroni*. (D) Western blot de preparaciones de músculo liso del uréter intravesical incubadas con anticuerpos para la CSE en ausencia y presencia de L-NOARG (100 μM). Los niveles de proteína fueron normalizados frente a los niveles de β-actina. Los resultados representan las medias ± SEM de 4 preparaciones de 4 animales. (E) Producción endógena de H₂S en ausencia y presencia de L-NOARG (100 μM), PPG (1 mM) y PPG junto con GYY4137 (10 μM). Los resultados representan la media ± SEM de 8 preparaciones de 8 animales. *,# $P < 0.05$, parámetro significativamente diferente con respecto a su valor control. Análisis de varianza (ANOVA) seguido de un *test de Bonferroni*.

1.2.2. Efecto del GYY4137 y del bloqueo de la NOS y de la CSE en la producción endógena de H₂S

En el músculo liso del uréter intravesical, la expresión de la CSE (n=4, N=4) (Figura 3 D) y la producción endógena de H₂S (n=8, N=8) (Figura 3 E), no fueron modificadas como consecuencia de la inhibición de la NOS con 100 μ M de L-NOARG (4.8 \pm 0.5 nM.min⁻¹.g⁻¹ y 4.4 \pm 0.5 nM.min⁻¹.g⁻¹ en ausencia y presencia de L-NOARG, respectivamente). Sin embargo, los niveles de producción de H₂S, fueron reducidos a tasas de 2.9 \pm 0.3 nM.min⁻¹.g⁻¹ en presencia del inhibidor de la CSE, PPG (1 mM). La adición de 10 mM de GYY4137 incrementó los niveles de producción de H₂S a valores próximos a los basales (3.8 \pm 0.5 nM.min⁻¹.g⁻¹) (Figura 3 E).

1.2.3. Efecto del bloqueo de la GCs, PKA, COX y de los canales K_{ATP}

Para investigar el papel de la GCs y de la PKA en la relajación ureteral inducida por el H₂S, se han realizado curvas de frecuencia- y concentración-respuesta, inducidas por la EET y el GYY4137, respectivamente, en ausencia y presencia de ODQ (5 μ M), indometacina (3 μ M) y KT5720 (3 μ M), bloqueantes de la GCs, COX y PKA, respectivamente. Dichos tratamientos no modificaron la relajación inducida tanto por la EET (Tabla 1) como por el GYY4137 (Tabla 2).

El incremento de la [K⁺] extracelular (80 mM) produjo una contracción sostenida del tono ureteral de 1.7 \pm 0.1 g (n=6, N=3). En dichas condiciones, el GYY4137, produjo relajación dependiente de la concentración de menor magnitud que la obtenida en preparaciones contraídas con U46619 (0.1 μ M). Los valores de pD₂ y Emax fueron de 7.8 \pm 0.1 y 7.7 \pm 0.1 y 83 \pm 8% y 63 \pm 7%* en preparaciones precontraídas con U46619 y SSF-K, respectivamente (n=7, N=4). La glibenclamida (1 μ M), bloqueante selectivo de los canales K_{ATP}, redujo la relajación inducida por EET y GYY4137 (Figura 4). Así, canales K_{ATP} están involucrados en la relajación ureteral mediada por H₂S.

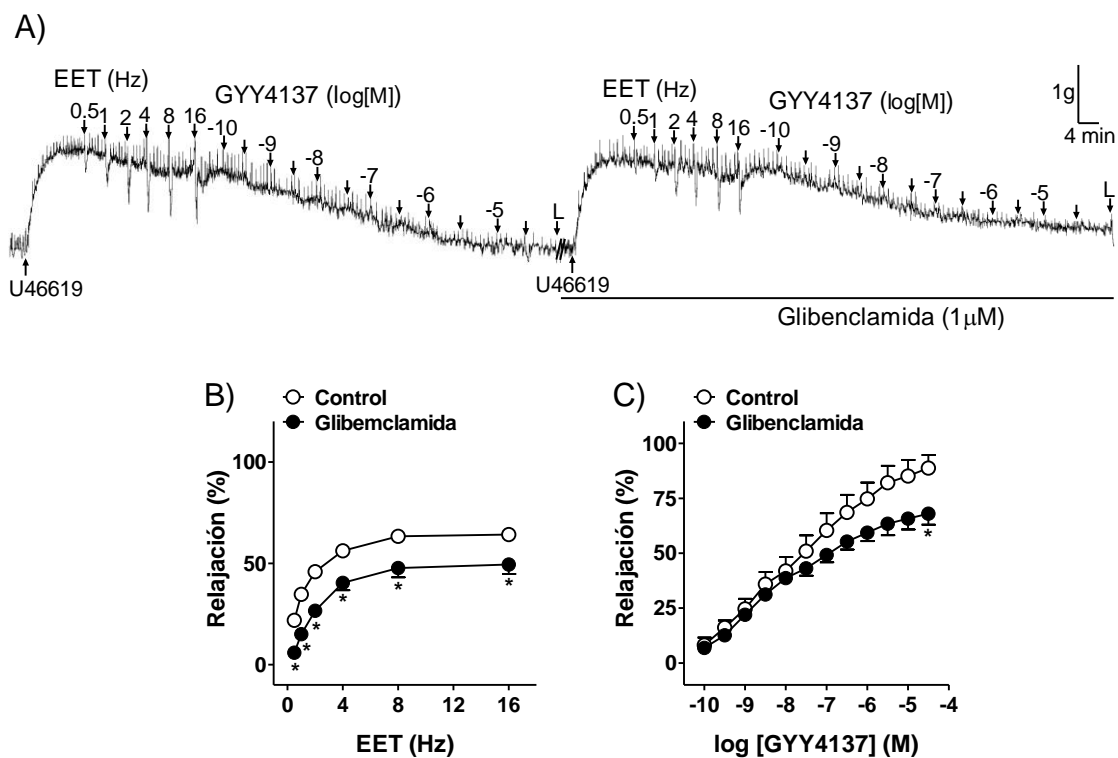


Figura 4. Efecto del bloqueo de los canales K_{ATP} en la relajación inducida por la EET y el GYY4137. (A) Registro de fuerza isométrica que muestra la relajación inducida por la EET (0.5-16 Hz) y GYY4137 (0.1 nM-30 μ M) en ausencia y presencia de glibenclamida (1 μ M). (B-C) Curva de relajación inducida por la EET (B) y GYY4137 (C) en ausencia (círculos vacíos, control) y presencia (círculos llenos) de glibenclamida. Los resultados se expresan como porcentaje de la inhibición de la precontracción inducida por el análogo U46619 (0.1 μ M) y representan la media \pm SEM de 8 preparaciones de 5 animales. * $P < 0.05$, parámetro significativamente diferente con respecto a su valor control. Test de *t Student* para observaciones pareadas.

1.2.4. Efecto de la desensibilización de las APSC y de los canales TRPA1 y TRPV1

Para estudiar el papel de las APSC y canales catiónicos TRPA1 y TRPV1, expresados en dichas aferentes, se ha realizado un grupo de experimentos bajo condiciones de desensibilización de dichas fibras con la neurotoxina capsaicina (10 μ M), y bloqueo de los canales TRPA1 y TRPV1, con HC030031 (60 μ M) y AMG9810 (10 μ M), respectivamente. Capsaicina (Figura 5 A y D), HC030031 (Figura 5 B y E) y AMG9810 (Figura 5 C y F), redujeron ostensiblemente la relajación inducida por la EET y el GYY4137. Estos resultados sugieren que parte de la relajación del H₂S es producida vía activación de canales TRPA1 y TRPV1 que promueven la liberación de mediadores inhibidores desde las APSC.

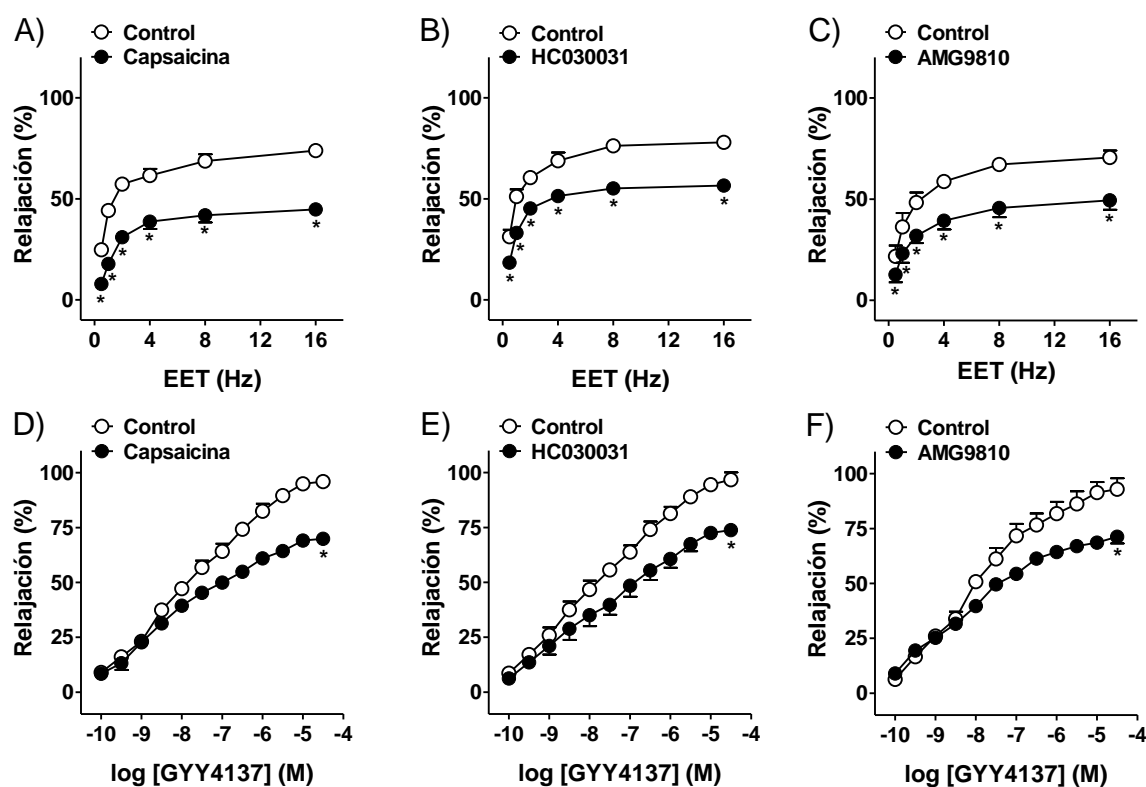


Figura 5. Efecto de la desensibilización de las APSC y del bloqueo de canales TRPA1 y TRPV1 en la relajación inducida por la EET y el GYY4137. Curvas de relajación inducida por la EET (0.5-16 Hz) (A-C) y por GYY4137 (0.1 nM – 30 μ M) (D-F), en ausencia (círculos vacíos, control) y presencia (círculos llenos) de 10 μ M de capsaicina (A y D), 60 μ M de HC030031 (B y E) y 10 μ M de AMG9810 (C y F). Los resultados se expresan como porcentaje de la inhibición de la precontracción inducida por el análogo U46619 (0.1 μ M) y representan la media \pm SEM de 7 preparaciones de 4 animales. * P <0.05, parámetro significativamente diferente con respecto a su valor control. Test de *t Student* para observaciones pareadas.

1.2.5. Efecto del bloqueo de los receptores VIP/PACAP y CGRP

En aras a investigar en papel de los neuropéptidos inhibidores VIP/PACAP y CGRP en la neurotransmisión sulfidrúrgica del uréter intravesical, las preparaciones fueron incubadas con antagonistas selectivos de los receptores VIP/PACAP y CGRP, PACAP₆₋₃₈ (3 μ M) (Figura 6 A y C) y CGRP₈₋₃₇ (3 μ M) (Figura 6 B y D), respectivamente. Dichos agentes redujeron significativamente la relajación inducida por la EET y el GYY4137, sugiriendo así, que la liberación de PACAP 38 y CGRP desde APSC podría esta involucrada en la relajación inducida por el H₂S.

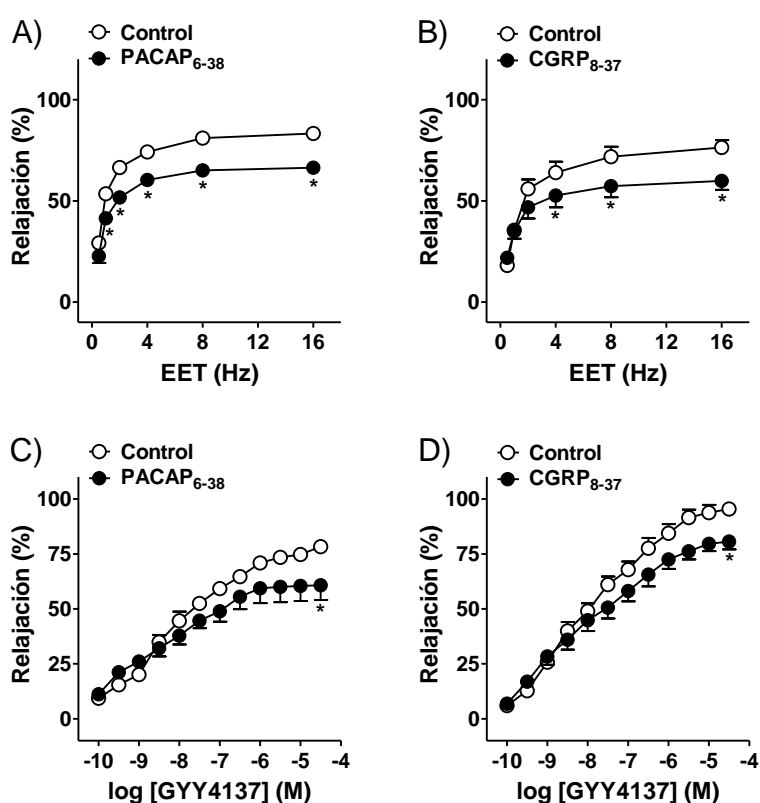


Figura 6. Efecto del bloqueo de receptores VIP/PACAP y CGRP en la relajación inducida por EET y GYY4137. Curvas de relajación inducida por la EET (0.5-16 Hz) (A-B) y el GYY4137 (0.1 nM – 30 μ M) (C-D), en ausencia (círculos vacíos, control) y presencia (círculos llenos) de 3 μ M de PACAP₆₋₃₈ (A y C) y 3 μ M de CGRP₈₋₃₇ (B y D). Los resultados se expresan como porcentaje de la inhibición de la precontracción inducida por el análogo U46619 (0.1 μ M) y representan la media \pm SEM de 7-8 preparaciones de 4 animales. * P <0.05, parámetro significativamente diferente con respecto a su valor control. Test de *t Student* para observaciones pareadas.

2. PAPEL DEL H₂S EN LA NEUROTRANSMISIÓN INHIBIDORA DEL CUELLO VESICAL

2.1. EXPRESIÓN DE LAS ENZIMAS CSE Y CBS

La expresión de las enzimas de síntesis de H₂S, CSE y CBS se investigó usando anticuerpos selectivos para CSE y CBS en combinación con el marcador neuronal PGP 9.5. Los estudios de inmunofluorescencia han demostrado la presencia de ambas enzimas, CSE y CBS, en fibras nerviosas ampliamente distribuidas en la capa muscular del cuello vesical y que discurren en paralelo a los haces de músculo liso (n=5, N=5) (Figura 7 A-H). Asimismo, se han identificado fibras inmunoreactivas positivas para la CSE y la CBS en alrededor de las arteriolas locales.

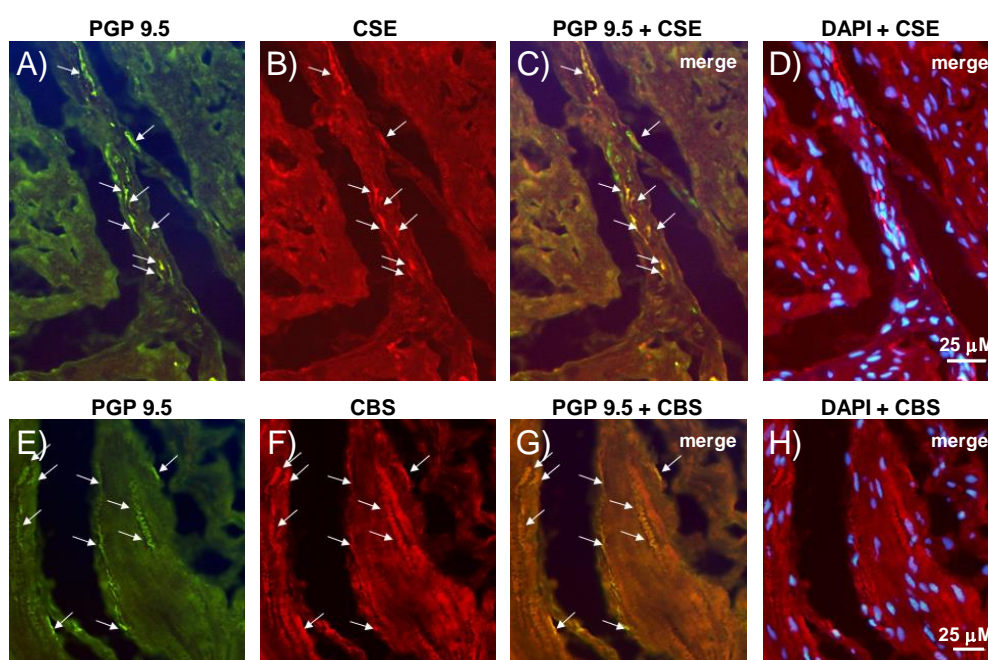


Figura 7. Expresión de las enzimas de síntesis de H₂S, CSE y CBS, en secciones transversales de músculo liso del cuello de la vejiga urinaria. (A y E) Fibras nerviosas del cuello vesical (inmunorreactividad de color verde indicada por las flechas). (B y F) Fibras positivas para la CSE y la CBS en el cuello vesical que discurren en paralelo a los haces del músculo liso (de color rojo indicadas por las flechas). (C y G) Inmunofluorescencia de doble marcaje para PGP 9.5 y CSE y/o CBS que revelan la colocalización de ambas enzimas en las terminaciones nerviosas (de color amarillo indicadas por las flechas). (D y H) Núcleos celulares marcados con DAPI (de color azul).

2.2. ESTUDIOS FUNCIONALES

Tiras longitudinales del cuello de la vejiga desprovistas de urotelio fueron normalizadas durante un periodo de 60 min hasta alcanzar una tensión pasiva de 1.8 ± 0.2 g (n=128, N=71). Las preparaciones fueron precontraídas con fenilefrina (FE), la cual, produjo una contracción sostenida de 2.2 ± 0.2 g (n=128, N=71).

Para estudiar la neurotransmisión inhibitoria independiente de NO, se han realizado curvas de EET en un rango de frecuencias entre 2 y 16 Hz en presencia del bloqueante de la sintasa de NO, L-NOARG (100 μ M) en condiciones NANC obtenida previa incubación con guanetidina (10 μ M) y atropina (0.1 μ M). La EET produjo una relajación dependiente de la frecuencia, siendo la máxima respuesta obtenida a una frecuencia de estimulación de 16 Hz ($141 \pm 9.1\%$ inhibición de la contracción inducida por la FE (1 μ M) (n=124, N=67). El donante de H₂S, GYY4137 (0.1 nM – 10 μ M), indujo una potente relajación, dependiente de la concentración de la musculatura lisa del cuello vesical (valores de pD₂ y E_{max} de 8.2 ± 0.1 y $98.3 \pm 1.3\%$, respectivamente, n=124, N=67).

2.2.1. Efecto del bloqueo de canales de Na⁺ neuronales y de las enzimas CSE y CBS

En aras a investigar el posible papel del H₂S en la neurotransmisión inhibitoria NANC, independiente de NO, se han realizado curvas de relajación frecuencia y/o concentración-respuesta, inducida por la EET y el GYY4137 en ausencia y presencia de TTX, PPG y AOAA, bloqueantes selectivos de los canales de Na⁺ neuronales dependientes de voltaje y de las enzimas CSE y CBS, respectivamente. TTX (1 μ M) produjo la abolición de la relajación inducida por la EET evidenciando así su carácter neurogénico (Figura 8 A y B; Tabla 3) (n=6, N=3). PPG (1 mM), por su parte, redujo la relajación inducida por la EET (Figura 9 A y B; Tabla 3) (n=8, N=4), la cual, no fue modificada en presencia de AOAA (1 mM) (Tabla 3) (n=6, N=3).

En preparaciones de músculo liso del cuello de la vejiga, tratadas con TTX, PPG o AOAA, no se observaron modificaciones de la relajación inducida por el GYY4137 (Figura 8 C y Figura 9 D; Tabla 4).

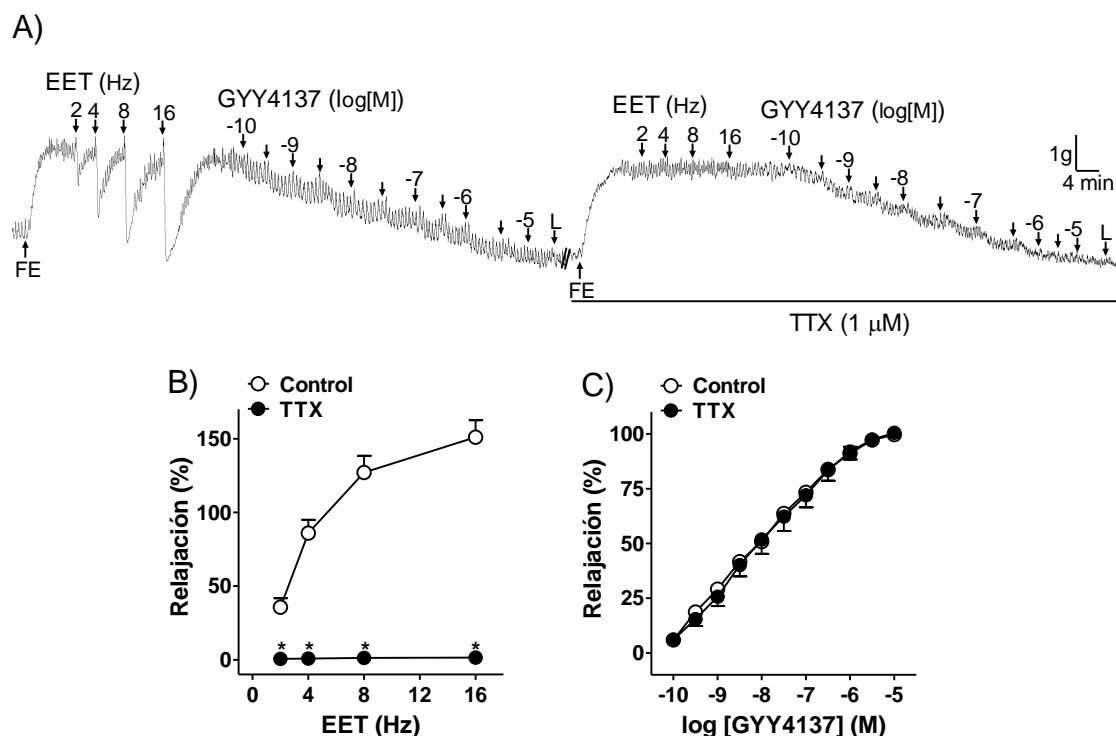


Figura 8. Efecto de la inhibición de canales de Na²⁺ neuronales en la relajación inducida por la EET y el GYY4137. (A) Registro de fuerza isométrica que muestra la relajación inducida por la EET (2-16 Hz) y el GYY4137 (0.1 nM-10 μM) en ausencia y presencia de TTX (1 μM) bajo condiciones NANC no-nitrérgicas. Curvas de relajación inducida por la EET (B) y GYY4137 (C) en ausencia (círculos vacíos, control) y presencia (círculos llenos) de TTX. Los resultados se expresan como porcentaje de la inhibición de la precontracción inducida por la FE (1 μM) y representan la media±SEM de 6 preparaciones de 3 animales. **P*<0.05, parámetro significativamente diferente con respecto a su valor control. Test de *t Student* para observaciones pareadas.

Tabla 3. Efecto del bloqueo de los canales de Na⁺ neuronales y de las enzimas de síntesis de H₂S, CSE y CBS, en la relajación inducida por la EET en el cuello de la vejiga urinaria.

		EET (Hz)			
	<i>n</i>	2	4	8	16
Control	6	36±6	86±9	127±9	151±1
TTX (1 μM)	6	0±0*	0±0*	0±0*	0±0*
Control	8	31±5	74±9	114±12	137±1
PPG (1 mM)	8	12±2*	28±6*	53±8*	70±8*
Control	6	23±3	46±5	76±8	99±7
AOAA (1 mM)	6	18±3	44±6	74±10	91±9

Los resultados se expresan como porcentaje de la inhibición de la precontracción inducida por la FE (1 μM) y representan la media±SEM de 6-8 preparaciones de 3-4 animales. **P*<0.05, parámetro significativamente diferente con respecto a su valor control. Test de *t Student* para observaciones pareadas.

Tabla 4. Efecto del bloqueo de los canales de Na⁺ neuronales y de las enzimas de síntesis de H₂S, CSE y CBS, en la relajación inducida por el GYY4137 en el cuello de la vejiga urinaria.

GYY4137			
	<i>n</i>	<i>pD</i> ₂	<i>E</i> _{max} (%)
Control	6	7.9±0.1	100±0
TTX (1 μM)	6	7.9±0.1	100±0
Control	8	8.3±0.1	92±4
PPG (1 mM)	8	8.0±0.1	94±3
Control	6	8.4±0.1	99±2
AOAA (1 mM)	6	8.6±0.1	98±2

Los resultados se expresan como porcentaje de la inhibición de la precontracción inducida por la FE (1 μM) y representan la media±SEM de 6-8 preparaciones de 3-4 animales. **P*<0.05, parámetro significativamente diferente con respecto a su valor control. Test de *t Student* para observaciones pareadas.

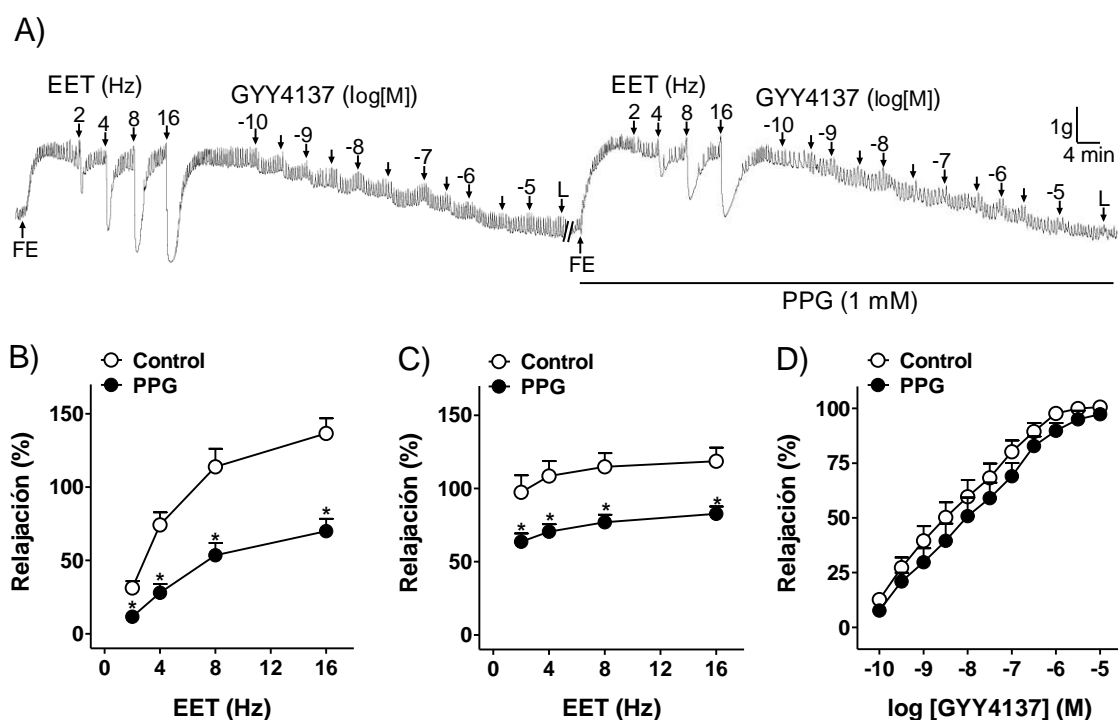


Figura 9. Efecto de la inhibición de la enzima CSE en la relajación inducida por la EET y el GYY4137. (A) Registro de fuerza isométrica que muestra la relajación inducida por la EET (2-16 Hz) y el GYY4137 (0.1 nM-10 μM) en ausencia y presencia de PPG (1 mM). (B-C) Curvas de relajación inducida por la EET en ausencia (círculos vacíos, control) y presencia (círculos llenos) de PPG en ausencia (B) y presencia (C) del bloqueante de la sintasa de NO, L-NOARG (100 μM). (D) Curvas de relajación inducida por el donante de H₂S, GYY4137 en ausencia (círculos vacíos, control) y presencia (círculos llenos) de PPG (1 mM). Los resultados se expresan como porcentaje de la inhibición de la precontracción inducida por la FE (1 μM) y representan la media±SEM de 6-8 preparaciones de 3-4 animales. **P*<0.05, parámetro significativamente diferente con respecto a su valor control. Test de *t Student* para observaciones pareadas.

2.2.2. Efecto del bloqueo de la GCs, PKA y canales de K⁺

Para investigar el papel de la GCs y de la PKA en la relajación inducida por el H₂S, se han realizado curvas de frecuencia- y concentración-respuesta inducidas por la EET y el GYY4137, respectivamente, en ausencia y presencia de ODQ (5 μM) y KT5720 (3 μM), bloqueantes de la GCs y la PKA, respectivamente. Dichos agentes no modificaron la relajación inducida por la EET y el GYY4137, descartando así, la implicación de dichas vías en la relajación de H₂S (Tablas 5 y 6).

En aras a estudiar el papel de los canales de K⁺ en la respuesta sulfidráulica, se han precontraído las preparaciones con una SSF-K (80 mM), la cual, produjo una contracción sostenida de las preparaciones de músculo liso del cuello vesical, de 2.1±0.1 g (n=7, N=4). La relajación inducida por el GYY4137 era menor en dichas muestras en comparación con la obtenida en preparaciones contraídas con FE (E_{max} del 85±7% y 61±7%*, en muestras contraídas con FE y SSF-K, respectivamente, *P<0.05, parámetro significativamente diferente con respecto a su valor control. Test de *t Student* para observaciones pareadas).

IbTX (100 nM), TRAM 34 (20 nM) y apamina (0.5 μM), inhibidores selectivos de los canales BK_{Ca}, IK_{Ca} y SK_{Ca}, respectivamente, no modificaron la respuesta a la EET o el GYY4137, descartando en principio el papel de dichos canales en la relajación inducida por el H₂S (Tablas 5 y 6). Sin embargo, la glibenclamida (1 μM) redujo la relajación inducida por la EET y el GYY4137, lo que sugiere que canales K_{ATP} estarían involucrados en la respuesta relajante sulfidráulica del cuello vesical (Figura 10) (n=8, N=4). La inhibición de los canales K_V con 4-AP (1 mM), incrementó el efecto inducida por EET (E_{max} a 16 Hz de 117±12% y 142±12%*, en ausencia y presencia de 4-AP, respectivamente (Tabla 5). El bloqueo de los K_V no modificó la relajación inducida por el GYY4137 (Tabla 6).

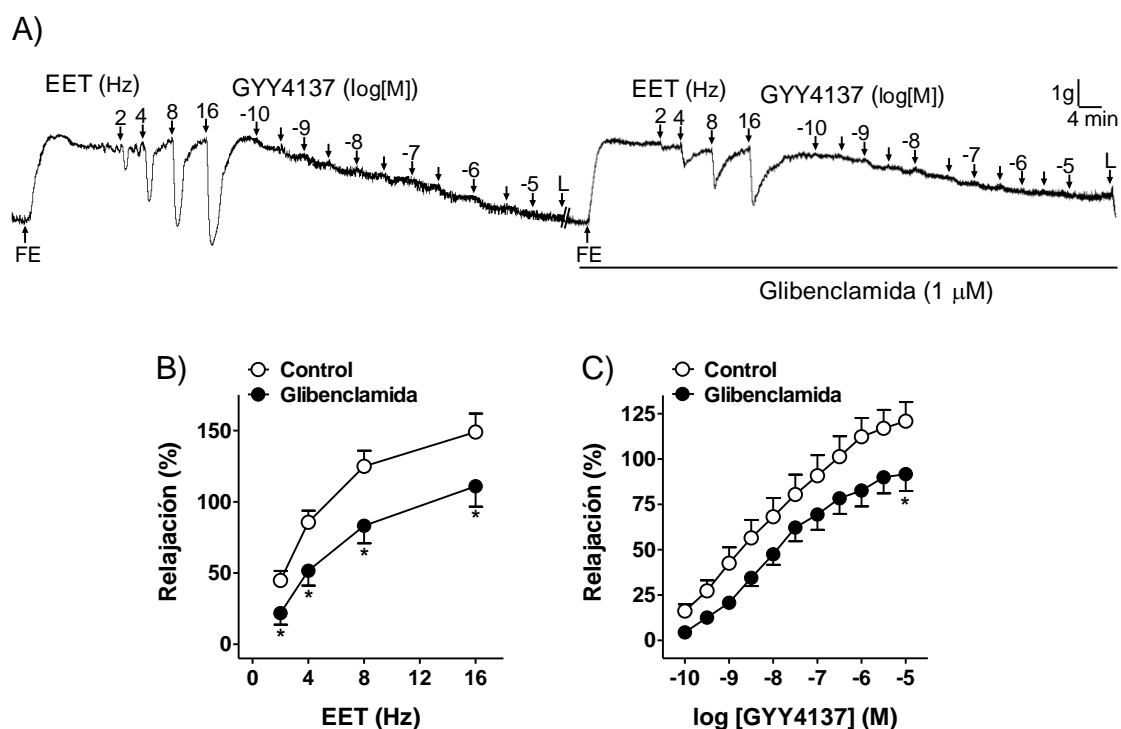


Figura 10. Efecto de la inhibición de canales K_{ATP} en la relajación inducida por la EET y el GYY4137. (A) Registro de fuerza isométrica que muestra la relajación inducida por la EET (2-16 Hz) y el GYY4137 (0.1 nM-10 μ M) en ausencia y presencia de glibenclamida (1 μ M). Curvas de relajación inducida por la EET (B) y el GYY4137 (C) en ausencia (círculos vacíos, control) y presencia (círculos llenos) de glibenclamida. Los resultados se expresan como porcentaje de la inhibición de la precontracción inducida por la FE (1 μ M) y representan la media \pm SEM de 8 preparaciones de 4 animales. * P <0.05, parámetro significativamente diferente con respecto a su valor control. Test de *t Student* para observaciones pareadas.

Tabla 5. Efecto del bloqueo de la GCs, PKA y los canales BK_{Ca}, IK_{Ca}, SK_{Ca}, K_{ATP} y K_V en la relajación inducida por la EET (2-16 Hz) en el cuello de la vejiga urinaria.

	<i>n</i>	EFS (Hz)			
		2	4	8	16
Control	6	22±4	44±6	78±9	109±9
ODQ (5 µM)	6	22±5	45±7	74±9	103±9
Control	6	35±6	63±9	88±8	109±7
KT 5720 (3 µM)	6	30±5	55±9	84±9	105±7
Control	6	19±5	38±7	65±6	88±5
IbTX (100 nM)	6	19±5	36±7	57±7	78±6
Control	6	42±6	88±10	110±12	130±10
TRAM 34 (20 nM)	6	46±5	81±9	106±11	117±10
Control	6	11±3	39±7	70±7	98±6
Apamina (0.5 µM)	6	13±3	34±5	71±9	96±8
Control	8	45±7	86±8	125±11	149±13
Glibenclamida (1 µM)	8	22±8*	52±10*	83±12*	111±14*
Control	7	31±7	67±9	95±11	117±12
4-AP (1 mM)	7	60±8*	101±9*	126±12*	142±12

Los resultados se expresan como porcentaje de la inhibición de la precontracción inducida por la FE (1 µM) y representan la media±SEM de 6-8 preparaciones de 3-4 animales. **P*<0.05, parámetro significativamente diferente con respecto a su valor control. Test de *t Student* para observaciones pareadas.

Tabla 6. Efecto del bloqueo de la GCs, PKA y canales BK_{Ca}, IK_{Ca}, SK_{Ca}, K_{ATP} y K_V en la relajación inducida por el GYY4137 (0.1 nM - 10 µM) en el cuello vesical.

	<i>n</i>	GYY4137	
		<i>pD</i> ₂	<i>E</i> _{max} (%)
Control	6	8.4±0.1	132±8
ODQ (5 µM)	6	8.3±0.1	124±9
Control	6	7.5±0.1	101±4
KT 5720 (3 µM)	6	7.4±0.1	100±4
Control	6	7.8±0.1	89±6
IbTX (100 nM)	6	8.0±0.1	91±8
Control	6	7.8±0.1	95±4
TRAM 34 (20 nM)	6	7.7±0.2	98±8
Control	6	7.8±0.1	93±6
Apamina (0.5 µM)	6	8.0±0.1	91±8
Control	8	8.8±0.1	121±8
Glibenclamida (1 µM)	8	-	92±7*
Control	8	7.9±0.1	92±7
4-AP (1 mM)	8	8.0±0.1	90±7

Los resultados se expresan como porcentaje de la inhibición de la precontracción inducida por la FE (1 µM) y representan la media±SEM de 6-8 preparaciones de 3-4 animales. **P*<0.05, parámetro significativamente diferente con respecto a su valor control. Test de *t Student* para observaciones pareadas.

2.2.3. Efecto de la desensibilización de las APSC y del bloqueo de canales TRPA1 y TRPV1

En aras a investigar el papel de las APSC en la relajación sulfidrérica, se ha llevado a cabo un grupo de experimentos donde se procedió a la desensibilización de dichas aferentes con capsaicina (10 μ M). Dicho tratamiento redujo significativamente la relajación inducida por la EET y el GYY4137 (Figura 11 y Tablas 7 y 8) ($n=8$, $N=4$). Asimismo, el bloqueo de los canales vaniloides, TRPA1 y TRPV1 con capsazepina (10 μ M), HC030031 (60 μ M) y AMG9810 (10 μ M), respectivamente, redujo la respuesta inducida por la EET y el GYY4137 (Figuras 12-14 y Tablas 7 y 8).

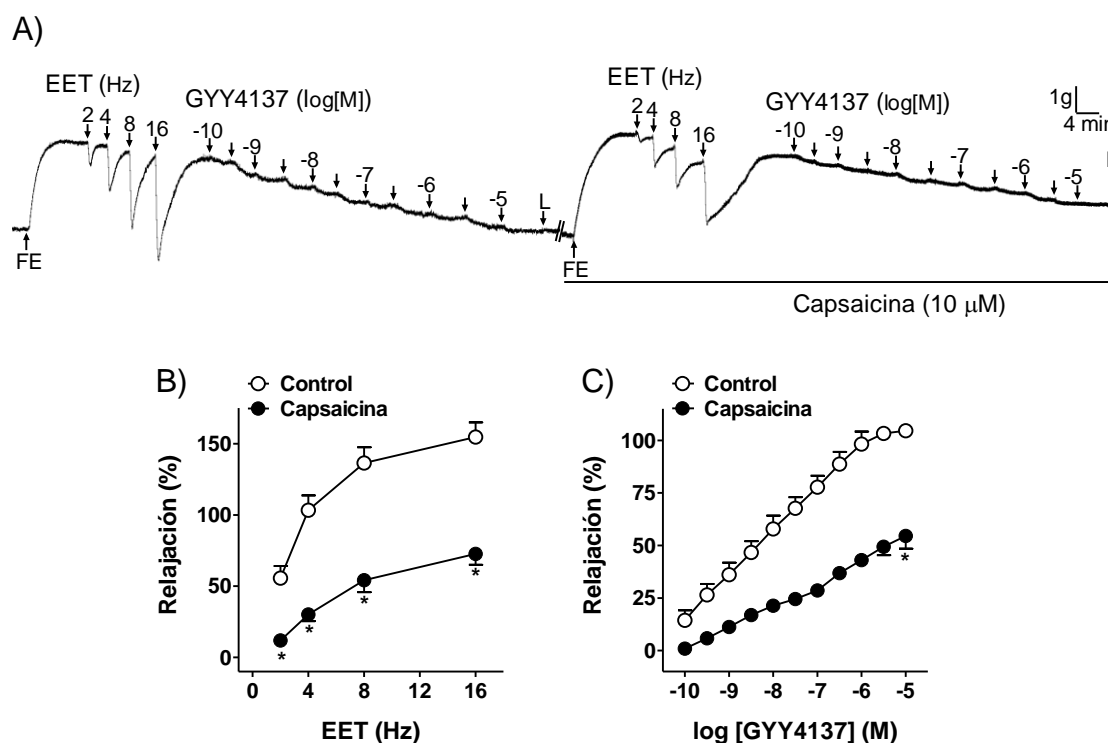


Figura 11. Efecto de la desensibilización de las APSC en la relajación inducida por la EET y el GYY4137. (A) Registro de fuerza isométrica que muestra la relajación inducida por la EET (2-16 Hz) y el GYY4137 (0.1 nM-10 μ M) en ausencia y presencia de capsaicina (10 μ M). Curvas de relajación inducida por la EET (B) y GYY4137 (C) en ausencia (círculos vacíos, control) y presencia (círculos llenos) de capsaicina. Los resultados se expresan como porcentaje de la inhibición de la precontracción inducida por la FE (1 μ M) y representan la media \pm SEM de 8 preparaciones de 4 animales. * $P<0.05$, parámetro significativamente diferente con respecto a su valor control. Test de *t Student* para observaciones pareadas.

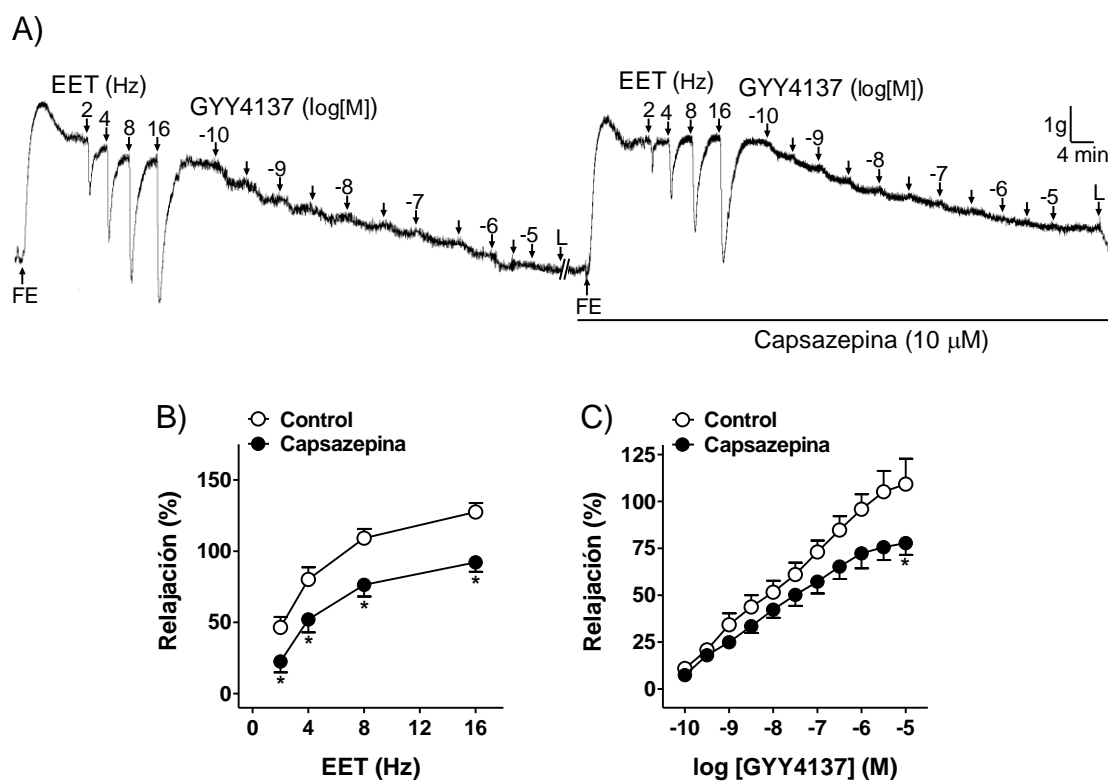


Figura 12. Efecto del bloqueo de los receptores vaniloides en la relajación inducida por la EET y el GYY4137. (A) Registro de fuerza isométrica que muestra la relajación inducida por la EET (2-16 Hz) y el GYY4137 (0.1 nM-10 μM) en ausencia y presencia de capsazepina (10 μM). Curvas de relajación inducida por la EET (B) y el GYY4137 (C) en ausencia (círculos vacíos, control) y presencia (círculos llenos) de capsazepina. Los resultados se expresan como porcentaje de la inhibición de la precontracción inducida por la FE (1 μM) y representan la media±SEM de 8 preparaciones de 4 animales. * $P < 0.05$, parámetro significativamente diferente con respecto a su valor control. Test de *t Student* para observaciones pareadas.

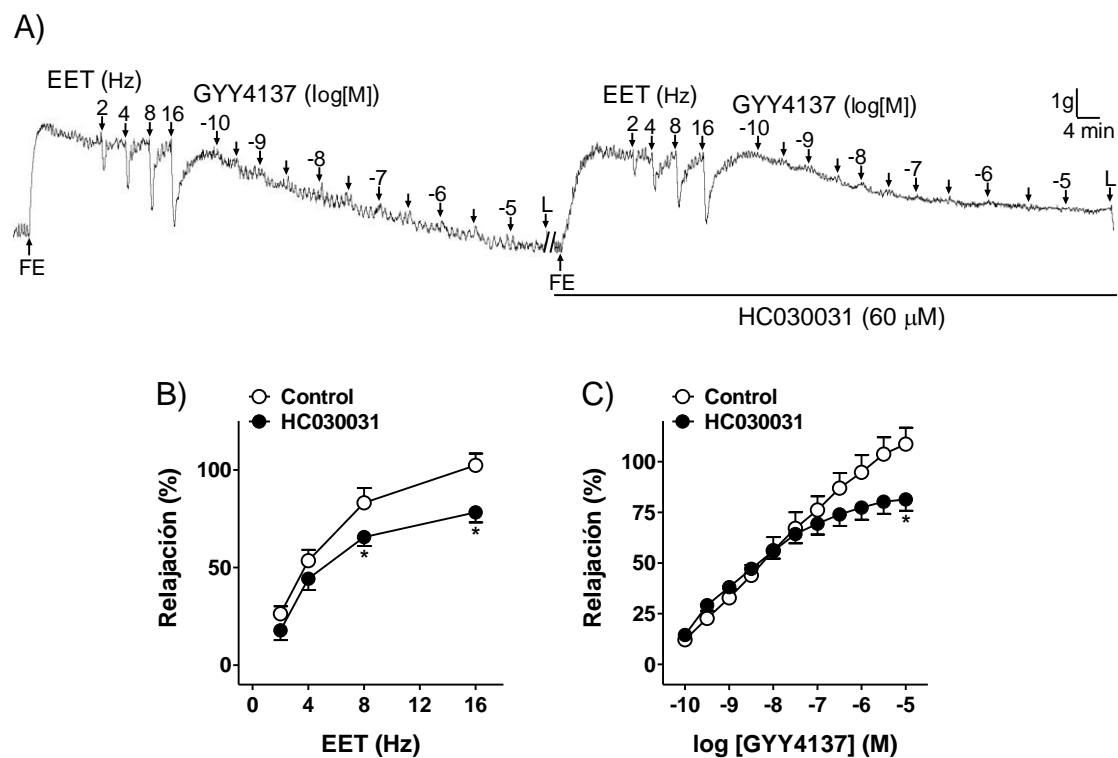


Figura 13. Efecto del bloqueo del canal TRPA1 en la relajación inducida por la EET y el GYY4137. (A) Registro de fuerza isométrica que muestra la relajación inducida por la EET (2-16 Hz) y el GYY4137 (0.1 nM-10 μ M) en ausencia y presencia de HC030031 (60 μ M). Curvas de relajación inducida por la EET (B) y el GYY4137 (C) en ausencia (círculos vacíos, control) y presencia (círculos llenos) de HC030031. Los resultados se expresan como porcentaje de la inhibición de la precontracción inducida por la FE (1 μ M) y representan la media \pm SEM de 7 preparaciones de 4 animales. * P <0.05, parámetro significativamente diferente con respecto a su valor control. Test de *t Student* para observaciones pareadas.

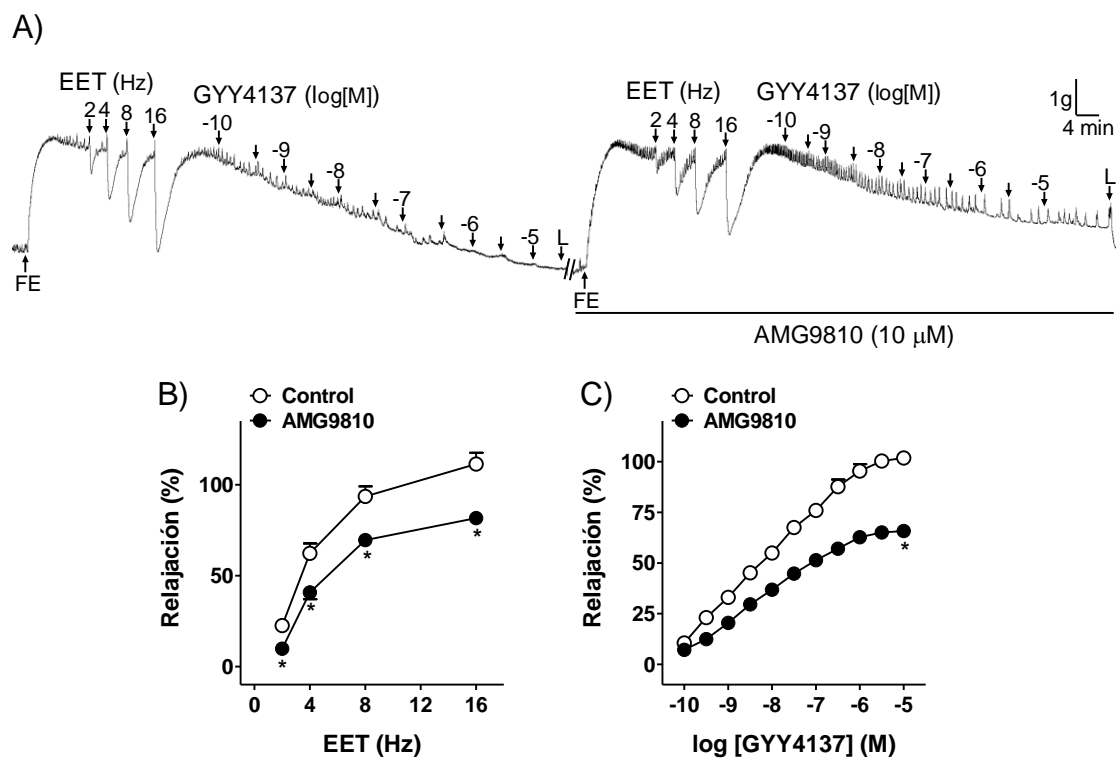


Figura 14. Efecto de la inhibición del canal TRPV1 en la relajación inducida por la EET y el GYY4137. (A) Registro de fuerza isométrica que muestra la relajación inducida por la EET (2-16 Hz) y el GYY4137 (0.1 nM-10 μM) en ausencia y presencia de AMG9810 (10 μM). Curvas de relajación inducida por la EET (B) y el GYY4137 (C) en ausencia (círculos vacíos, control) y presencia (círculos llenos) de AMG9810. Los resultados se expresan como porcentaje de la inhibición de la precontracción inducida por la FE (1 μM) y representan la media±SEM de 8 preparaciones de 4 animales. * $P < 0.05$, parámetro significativamente diferente con respecto a su valor control. Test de *t Student* para observaciones pareadas.

Tabla 7. Efecto de la desensibilización de las APSC y de la inhibición de los canales vaniloides, TRPA1 y TRPV1 en la relajación inducida por la EET (2-16 Hz) en el cuello vesical.

	<i>n</i>	EFS (Hz)			
		2	4	8	16
Control	8	57±8	103±10	136±11	155±10
Capsaicina (10 µM)	8	12±2*	30±5*	54±8*	72±7*
Control	8	46±7	80±8	109±6	127±6
Capsazepina (10 µM)	8	22±7*	52±9*	76±8*	92±6*
Control	7	26±4	54±5	83±8	102±6
HC030031 (60 µM)	7	18±5	44±6	66±4*	78±5*
Control	8	23±3	62±5	94±6	111±6
AMG9810 (10 µM)	8	10±2*	41±4*	69±3*	82±2*

Los resultados se expresan como porcentaje de la inhibición de la precontracción inducida por la FE (1 µM) y representan la media±SEM de 7-8 preparaciones de 4 animales. * $P<0.05$, parámetro significativamente diferente con respecto a su valor control. Test de *t Student* para observaciones pareadas.

Tabla 8. Efecto de la desensibilización de las APSC y de la inhibición de los canales vaniloides, TRPA1 y TRPV1 en la relajación inducida por el GYY4137 (0.1 nM - 10 µM) en el cuello vesical.

	GYY4137		
	<i>n</i>	pD_2	E_{max} (%)
Control	8	8.0±0.1	105±3
Capsaicina (10 µM)	8	-	55±5*
Control	8	7.8±0.1	112±9
Capsazepina (10 µM)	8	-	96±2*
Control	7	8.0±0.1	109±8
HC030031 (60 µM)	7	-	81±6*
Control	8	8.1±0.1	102±3
AMG9810 (10 µM)	8	-	66±3*

Los resultados se expresan como porcentaje de la inhibición de la precontracción inducida por la FE (1 µM) y representan la media±SEM de 7-8 preparaciones de 4 animales. * $P<0.05$, parámetro significativamente diferente con respecto a su valor control. Test de *t Student* para observaciones pareadas.

2.2.4. Efecto del bloqueo de receptores VPAC, CGRP y prostanóides

PACAP₆₋₃₈ (3 μ M) y CGRP₈₋₃₇ (3 μ M), redujeron la relajación inducida por la EET y el GYY4137 (Tabla 9 y 10), sugiriendo así, que parte de la relajación inducida por el H₂S es producida indirectamente vía liberación desde las APSC de PACAP 38 y CGRP. La indometacina (3 μ M) y el SC560 (1 μ M), inhibidores de la COX y COX-1, respectivamente, disminuyeron la relajación inducida por la EET y el GYY4137, mientras que, sin embargo, el inhibidor selectivo de la COX-2, NS398 (1 μ M) no modificó dichas respuestas (Figura 15 y 16; Tabla 9 y 10). Estos resultados sugieren que prostanoides derivados de la COX-1, liberados desde las APSC, estarían, asimismo, involucrados en la relajación inducida por el H₂S.

Tabla 9. Efecto de la inhibición de receptores VPAC, CGRP y prostanoides en la relajación inducida por la ET (2-16 Hz) en el cuello vesical.

	<i>n</i>	EFS (Hz)			
		2	4	8	16
Control	8	28±8	56±9	81±11	103±10
PACAP ₆₋₃₈ (3 μ M)	8	12±5*	33±7*	51±7*	73±5*
Control	8	16±7	43±12	70±11	97±7
CGRP ₈₋₃₇ (3 μ M)	8	6±3*	19±8*	38±12*	72±10*
Control	6	38±3	67±5	88±7	103±6
Indometacina (3 μ M)	6	18±2*	41±8*	68±9*	85±8*
Control	6	41±9	75±10	102±9	123±9
SC 560 (1 μ M)	6	22±9*	42±11*	69±9*	96±5*
Control	7	28±8	64±9	90±10	106±10
NS 398 (1 μ M)	7	21±9	57±10	82±11	100±10

Los resultados se expresan como porcentaje de la inhibición de la precontracción inducida por la FE (1 μ M) y representan la media±SEM de 6-8 preparaciones de 3-4 animales. **P*<0.05, parámetro significativamente diferente con respecto a su valor control. Test de *t Student* para observaciones pareadas.

Tabla 10. Efecto de la inhibición de receptores VPAC, CGRP y prostanóides en la relajación inducida por GYY4137 (0.1 nM - 10 μ M) en el cuello vesical.

GYY4137			
	<i>n</i>	<i>pD</i> ₂	<i>E</i> _{max} (%)
Control	8	8.3 \pm 0.1	120 \pm 9
PACAP ₆₋₃₈ (3 μ M)	8	-	104 \pm 7*
Control	8	8.0 \pm 0.2	114 \pm 4
CGRP ₈₋₃₇ (3 μ M)	8	-	93 \pm 8*
Control	6	8.3 \pm 0.1	108 \pm 4
Indometacina (3 μ M)	6	-	89 \pm 6*
Control	6	7.9 \pm 0.1	102 \pm 2
SC560 (1 μ M)	6	-	74 \pm 2*
Control	6	8.0 \pm 0.2	103 \pm 8
NS398 (1 μ M)	6	8.0 \pm 0.1	96 \pm 6

Los resultados se expresan como porcentaje de la inhibición de la precontracción inducida por la FE (1 μ M) y representan la media \pm SEM de 6-8 preparaciones de 3-4 animales. **P*<0.05, parámetro significativamente diferente con respecto a su valor control. Test de *t Student* para observaciones pareadas.

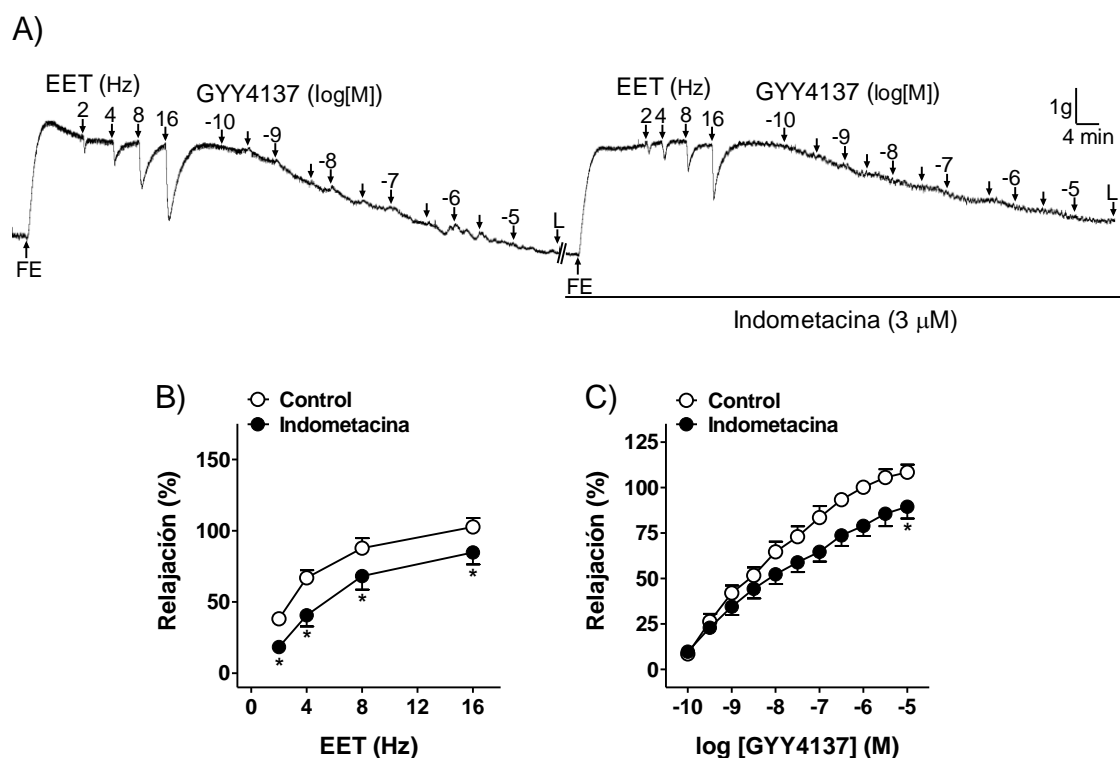


Figura 15. Efecto de la inhibición de la vía de las ciclooxygenasa en la relajación inducida por la EET y el GYY4137. (A) Registro de fuerza isométrica que muestra la relajación inducida por la EET (2-16 Hz) y el GYY4137 (0.1 nM-10 μ M) en ausencia y presencia de indometacina (3 μ M). Curva de relajación inducida por la EET (B) y GYY4137 (C) en ausencia (círculos vacíos, control) y presencia (círculos llenos) de indometacina. Los resultados se expresan como porcentaje de la inhibición de la precontracción inducida por la FE (1 μ M) y representan la media \pm SEM de 6 preparaciones de 3 animales. **P*<0.05, parámetro significativamente diferente con respecto a su valor control. Test de *t Student* para observaciones pareadas.

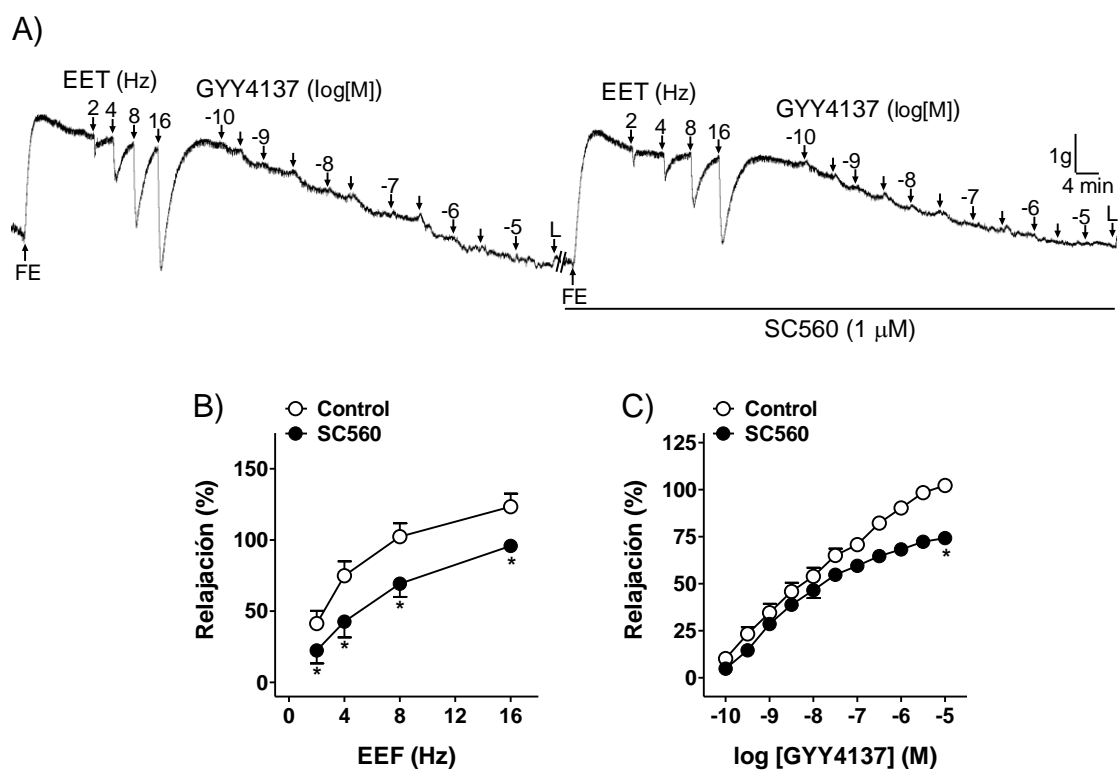


Figura 16. Efecto de la inhibición de la COX-1 en la relajación inducida por la EET y el GYY4137. (A) Registro de fuerza isométrica que muestra la relajación inducida por la EET (2-16 Hz) y el GYY4137 (0.1 nM-10 μM) en ausencia y presencia de SC560 (1 μM). Curvas de relajación inducida por la EET (B) y el GYY4137 (C) en ausencia (círculos vacíos, control) y presencia (círculos llenos) de SC560. Los resultados se expresan como porcentaje de la inhibición de la precontracción inducida por la FE (1 μM) y representan la media ± SEM de 6 preparaciones de 3 animales. **P* < 0.05, parámetro significativamente diferente con respecto a su valor control. Test de *t Student* para observaciones pareadas.

2.3. REGISTRO SIMULTÁNEO DE Ca^{2+} Y TENSIÓN

Las preparaciones de músculo liso del cuello vesical presentaron un ratio (F_{340}/F_{380}) basal de 0.98 ± 0.04 ($n=4$, $N=4$). La estimulación con FE ($1 \mu\text{M}$) o con una SSF-K (80 mM) produjo incrementos simultáneos de la tensión ($0.9 \pm 0.2 \text{ g}$ y $0.5 \pm 0.1 \text{ g}$, respectivamente) y $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ($\Delta[F_{340}/F_{380}]$) (0.27 ± 0.05 y 0.18 ± 0.04 , respectivamente) (Figura 17, $n=4$, $N=4$). El GYY4137 (1 nM , $0.1 \mu\text{M}$ y $10 \mu\text{M}$), inhibió el incremento de la tensión inducido por la FE o por la SSF-K, pero apenas modificó la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Figura 17 A-C y E-G) ($n=4$, $N=4$). La relación entre el $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y la tensión en la respuesta inducida por el GYY4137 en preparaciones precontraídas con FE o SSF-K muestra una escasa dependencia del $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en la relajación inducida por el H_2S (Figura 17 D y H) ($n=4$, $N=8$), sugiriendo así, que mecanismos de desensibilización al Ca^{2+} estarían involucrados en dicha respuesta.

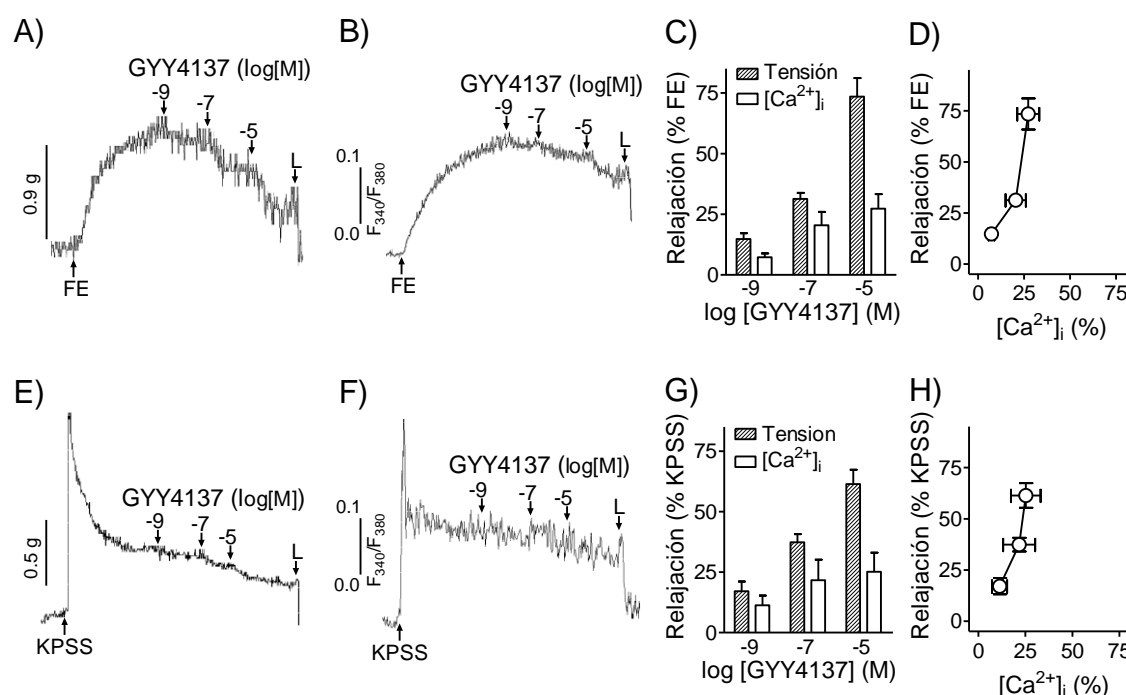


Figura 17. Efecto del GYY4137 en la tensión y la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Registro simultáneo de la tensión (A y E) y la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (B y F) que muestran el efecto de dosis acumulativas de GYY4137 (1 nM , $0.1 \mu\text{M}$ y $10 \mu\text{M}$) en preparaciones de cuello vesical precontraídas con la FE ($1 \mu\text{M}$) (A y B) y/o SSF-K (80 mM) (E y F). (C y G) Histogramas que muestran los cambios producidos en la tensión y la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. (D y H) Curvas que muestran la relación entre la tensión y la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en la respuesta relajación inducida por el GYY4137 en preparaciones precontraídas con la FE (D) y SSF-K (H). Los resultados se expresan como porcentaje de la inhibición de la precontracción inducida por la FE ($1 \mu\text{M}$) y la SSF-K (80 mM) y representan la media \pm SEM de 4 preparaciones de 4 animales.

V. DISCUSIÓN

En nuestro estudio se ha investigado el papel del H₂S en la neurotransmisión inhibitoria del uréter intravesical y del cuello de la vejiga urinaria. Nuestros resultados sugieren que dicho gas actúa como un potente neurotransmisor produciendo la relajación de la musculatura lisa ureteral y del cuello vesical vía mecanismos dependientes de la activación de los canales K_{ATP} y de la liberación de neuropéptidos sensoriales inhibidores.

Diversos estudios establecieron que el NO era el principal neurotransmisor inhibitorio NANC ureteral involucrado en la regulación de la contractilidad de la musculatura lisa a través de la activación de la GCs y de los canales K_{ATP} (Hernández *et al.*, 1995; Hernández *et al.*, 1997). Junto con el NO, se identificó, asimismo, un componente relajante neurogénico independiente de NO de naturaleza desconocida. Debido a ello, nuestro estudio ha ido dirigido a investigar el posible papel del H₂S en dicha respuesta. Los resultados obtenidos en el presente estudio proporcionan evidencias morfológicas y funcionales de que el H₂S neuronal, sintetizado por acción de la CSE, estaría involucrado en la neurotransmisión inhibitoria NANC, independiente de NO, en el uréter intravesical del cerdo. El H₂S produce relajación de la musculatura lisa vía activación de canales K_{ATP} y facilitando la liberación de neuropéptidos inhibidores como el PACAP 38 y el CGRP desde las APSC a través de la activación de canales TRPA1 y TRPV1 y/o canales iónicos relacionados (Fernandes *et al.*, 2014). Esto es sugerido sobre la base de la existencia de: 1) Una rica presencia de la sintasa de H₂S, CSE en fibras nerviosas ampliamente distribuidas en la capa muscular lisa. 2) La relajación neurogénica inducida por la EET era reducida por el inhibidor de la CSE, PPG y abolida por el bloqueo de los canales de Na⁺ neuronales con TTX. 3) La respuesta inducida por la EET y el GYY4137 era disminuida como consecuencia del bloqueo de los canales K_{ATP}, la desensibilización de las APSC y la inhibición de los canales TRPA1 y TRPV1 y de los receptores VPAC y CGRP.

En el uréter intravesical únicamente se ha identificado la expresión de la CSE. De hecho, el *Western blot* reveló la presencia de una banda a 45 kDa, compatible con el peso molecular esperado para la proteína CSE. Asimismo, la inmunofluorescencia identificó la presencia de la CSE en fibras nerviosas que discurren, de forma paralela, al eje longitudinal de los haces de músculo liso. Asimismo, se ha observado inmunoreactividad positiva para la CSE alrededor de las arteriolas ureterales, sugiriendo así, un posible papel modulador del H₂S en el flujo sanguíneo local (Tang *et al.*, 2005).

En el presente estudio, los estudios funcionales mostraron que el inhibidor de la CSE, PPG, reducía la relajación inducida por la EET, mientras que, sin embargo, el bloqueante de la CBS, AOAA no modificó dicha respuesta. Estos resultados están en consonancia con la expresión, únicamente, de la proteína CSE en la pared ureteral revelado con la inmunohistoquímica. Asimismo, la producción endógena de H₂S era reducida significativamente por el PPG y recuperada, parcialmente, en respuesta a la estimulación con el donante de H₂S, GYY4137. En conjunto, estos resultados sugieren que el H₂S endógeno, sintetizado por la CSE, y liberado desde las terminaciones nerviosas intramurales, está involucrado en la neurotransmisión inhibidora NANC del uréter intravesical. Asimismo, la incubación conjunta de PPG y L-NOARG, bloqueante de la sintasa de NO, abolió la relajación neurogénica inducida por la EET, indicando así, que NO y H₂S son los dos mediadores responsables de la neurotransmisión NANC inhibidora ureteral. De hecho, ambas moléculas gaseosas estarían directamente involucradas en la modulación de tensión muscular lisa ureteral favoreciendo la reducción de la resistencia ureteral y facilitando el paso del bolo de orina durante el llenado vesical.

El uréter intravesical, presenta, además de las fibras musculares longitudinales predominantes, fibras circulares y helicoidales (Prieto *et al.*, 1993; Prieto *et al.*, 1994). Esta característica de la morfología de la pared muscular ureteral sugiere que otros mecanismos podrían estar implicados en la regulación de la contractilidad ureteral. En nuestro estudio, la acción del donante GYY4137 sobre la amplitud y frecuencia de las espigas generadas en la contracción inducida por el análogo del tromboxano U46619 no fue observado de forma consistente por lo que estudios *in vivo* serían necesarios para investigar los cambios producidos por el H₂S sobre los parámetros urodinámicos del uréter distal.

En el músculo liso vascular, el NO puede regular la actividad enzimática de la CSE funcionando como inductor y/o interruptor de la síntesis de H₂S endógeno (Wang, 2012). En la presente investigación, la inhibición de la sintasa de NO no produjo modificaciones en la tasa de producción de H₂S endógeno. Estos resultados sugieren que mecanismos independientes del NO estarían involucrados en la regulación de la síntesis de H₂S en el uréter intravesical. La regulación de la formación de H₂S endógeno vía CSE, podría depender de mecanismos dependientes del *Complejo Ca²⁺-calmodulina* (Wang, 2012), lo cual, está en consonancia con lo observado en el cuello de la vejiga, donde no hay una relación sinérgica en la relajación neurogénica

nitrérgica y sulfidrérgica del músculo liso (Fernandes *et al.*, 2013b). Los resultados del presente estudio ponen de manifiesto que H₂S y NO median la relajación neurogénica del uréter intravesical, reforzando el papel de regulación del SNA sobre la tensión del uréter distal en contraste con lo observado en los segmentos pieloureterales, en donde las espigas generadas miogénicas son consecuencia de la actividad eléctrica de un marcapasos de localización intrarenal (Prieto *et al.*, 1993; Prieto *et al.*, 1994; Hernández *et al.*, 1995; Hernández *et al.*, 1997).

El donante de H₂S, GYY4137, produjo una potente relajación del músculo liso del uréter intravesical, de inicio lento y desarrollo sostenido. La eliminación mecánica del urotelio, así como, la incubación con PPG y L-NOARG no modificaron la respuesta inducida por el GYY4137. Estos resultados sugieren que el H₂S produce relajación del músculo liso vía mecanismos independientes del urotelio y del NO.

En el lecho vascular, el H₂S, vía mecanismos dependientes del NO endotelial, incrementa las concentraciones intracelulares de GMPc activando la PKG, y produciendo vasodilatación. Asimismo, el H₂S podría actuar sobre otras dianas moleculares vía sulfidración proteica e incrementando las concentraciones intracelulares de GMPc (Coletta *et al.*, 2012). Por ello, se ha investigado el papel del GMPc en la respuesta mediada por H₂S. El tratamiento con ODQ, inhibidor de la GCs, disminuye la relajación inducida por la EET. Este resultado es consistente con estudios previos que demostraron que la relajación neurogénica nitrérgica es producida, en parte, por la activación de la GCs (Hernández *et al.*, 1997). Sin embargo, el ODQ no modificó la respuesta inducida por el GYY4137, lo que inicialmente descarta una posible implicación de la vía NO/GMPc en la relajación ureteral mediada por el H₂S. Estos resultados están en consonancia con los obtenidos en las arterias mesentéricas, en donde el efecto vasodilatador inducido por el NaHS es independiente de la vía GMPc/PKG (Beltowski & Jamroz-Wiśniewska, 2014).

En células endoteliales de arterias pulmonares del cerdo, el H₂S inhibe la formación de aniones superóxido vía AC/PKA (Muzaffar *et al.*, 2008). En el uréter intravesical, el KT5720, inhibidor de la PKA, no modificó la respuesta inducida por EET o por GYY4137, lo que descarta la implicación de la PKA en la relajación inducida por H₂S.

La activación de canales K_{ATP} es responsable, en gran parte, de la relajación del músculo liso vascular y visceral inducido por el H₂S. El H₂S produce vasodilatación de arterias aorta y mesentérica de rata (Zhao *et al.*, 2001; Tang *et al.*, 2005; Wang, 2012) y

del cuello de la vejiga (Fernandes *et al.*, 2013a) vía apertura de canales K_{ATP} . En preparaciones del uréter intravesical precontraídas con una SSF-K, la relajación inducida por el GYY4137 era de menor magnitud que la observada en muestras precontraídas con el análogo del tromboxano U46619. La elevación de las concentraciones extracelulares de K^+ inhibe el flujo de iones K^+ a través de canales de K^+ de membrana, por lo que la reducción en la relajación obtenida sugiere la participación de canales de K^+ en dicho efecto. Asimismo, la glibenclamida, inhibidor de los canales K_{ATP} , redujo la relajación inducida por la EET y el GYY4137, lo que sugiere que canales K_{ATP} están involucrados en la relajación inducida por el H_2S . La activación de dichos canales estaría, asimismo, involucrada en la relajación nitrérgica ureteral (Hernández *et al.*, 1997).

Las COXs juegan un papel fundamental en la fisiología y fisiopatología vesical. Así, prostanoïdes derivados de las COXs modulan la contractilidad de la musculatura lisa de la pared de la vejiga urinaria (de Jongh *et al.*, 2007; Streng *et al.*, 2008; Andersson, 2010; Fernandes *et al.*, 2013a). En el presente estudio, la inhibición farmacológica de las COX, con indometacina, no produjo alteraciones de la relajación inducida por la EET y el GYY4137, por lo que no parece probable que prostanoïdes, derivados de la COX, estén involucrados en dicha respuesta.

El H_2S produce contracción del detrusor de la rata, a través de mecanismos dependientes de taquicininas contráctiles, como la SP y la NKA, liberados desde las APSC vía activación de canales catiónicos TRPA1 y TRPV1 (Patacchini *et al.*, 2004, 2005; Streng *et al.*, 2008). Neuropeptidos sensoriales, como el PACAP 38, disminuyen la contractilidad ureteral (Hernández *et al.*, 2004). Por ello, se ha investigado si la liberación de neuropeptidos inhibidores como PACAP 38 y/o CGRP podría estar involucrados en la respuesta relajante sulfidrérica. La desensibilización de las APSC con capsaicina produjo una disminución de la respuesta relajante inducida por la EET y el GYY4137, lo que indica la implicación de fibras sensoriales en la relajación inducida por el H_2S . Los canales TRPA1 son unas reconocidas dianas moleculares del H_2S . En la presente investigación, la inhibición farmacológica de dichos canales, con HC030031, redujo la relajación ureteral inducida el EET y el GYY4137. Asimismo, en presencia de AMG9810, inhibidor selectivo de los canales TRPV1, la relajación inducida por la EET y el GYY4137 fue reducida. Estos resultados, en conjunto, sugieren que la activación de canales iónicos TRPA1 y TRPV1, presentes en las APSC, estaría involucrada en la relajación inducida por el H_2S . El hecho que la disminución de la

relajación de H₂S producida por la capsaicina sea de mayor magnitud que la observada con los inhibidores HC030031 y AMG9810, sugiere que, junto con los canales TRPA1 y TRPV1, otros canales iónicos de las fibras sensoriales podrían estar involucrados en la relajación sulfidrérica.

La inhibición de la relajación inducida por la EET y el GYY4137 en presencia de los antagonistas selectivos de los receptores VIP/PACAP y CGRP, sugiere que el H₂S facilita la liberación de neuropéptidos inhibidores, como el PACAP 38 y el CGRP, desde las APSC vía activación de canales TRPA1 y TRPV1, sugiriendo así, que parte de la relajación de H₂S es producida indirectamente vía liberación de dichos péptidos inhibidores desde nervios sensoriales.

Donantes de H₂S han sido propuestos como herramientas farmacológicas para el tratamiento de patologías de las vías urinarias como la hidronefrosis causada por uropatía obstructiva unilateral, fibrosis renal atenuante, estrés oxidativo y otros procesos inflamatorios (Jung *et al.*, 2013). Los mecanismos neurogénicos desempeñan un papel primordial en el control de la motilidad ureteral. En el hombre, la innervación eferente y aferente del uréter intravesical de naturaleza colinérgica, adrenérgica y NANC, es bastante más densa que la innervación observada en la pelvis renal (Edyvane *et al.*, 1992; Santicioli & Maggi, 1998). Gran parte de los cálculos renales se localizan frecuentemente enclavados en los segmentos distales ureterales (Porpiglia *et al.*, 2000), por lo que es necesario investigar la regulación ejercida por el SNA sobre la contractilidad de la musculatura lisa ureteral, en aras a proporcionar dianas terapéuticas efectivas para el tratamiento de patologías ureterales obstructivas, facilitando el paso espontáneo de cálculos renales a través del uréter, aliviando los síntomas del cólico nefrítico y proporcionar una buena preparación para la ureteroscopia. Previamente se ha demostrado la implicación del NO y de un mediador de naturaleza desconocida en la regulación neurogénica del tono ureteral (Hernández *et al.*, 1995; Hernández *et al.*, 1997). El presente estudio demuestra que, junto con el NO, el H₂S es la molécula de señalización intracelular responsable de parte de la neurotransmisión inhibitoria NANC del uréter intravesical. Nuestra investigación proporciona evidencias morfológicas y funcionales de que el H₂S, sintetizado por acción de la CSE, actúa como un potente neurotransmisor inhibidor gaseoso en la regulación de la contractilidad ureteral. EL H₂S produce relajación de la musculatura lisa vía mecanismos independientes de NO a través de la activación directa de canales K_{ATP}. Asimismo, el H₂S facilita la liberación de neuropéptidos inhibidores, PACAP 38 y

CGRP desde las APSC, vía activación de canales TRPA1 y TRPV1 y/o involucrando otros canales iónicos de nervios sensoriales (Figura 18). Este es el primer estudio que demuestra la implicación del H₂S en la relajación neurogénica del uréter intravesical. El H₂S podría constituir una diana terapéutica de gran utilidad en procesos patológicos asociados con la obstrucción ureteral y el reflujo vésicoureteral.

En lo concerniente al cuello de la vejiga urinaria, H₂S endógeno actúa también como molécula señalizadora, independiente de NO, clave en la neurotransmisión inhibitoria. Esta conclusión es mantenida por las siguientes observaciones: 1) la presencia de CSE y CBS en fibras nerviosas ampliamente distribuidas en la capa de músculo liso. 2) La EET produce una relajación dependiente de la frecuencia que era significativamente reducida en presencia del inhibidor de la CSE y abolida por la TTX. 3) En donante de H₂S, GYY4137, induce una potente relajación dependiente de la concentración cuya respuesta no era modificada con el bloqueo de la CSE, CBS y canales de Na⁺ neuronales dependientes de voltaje.

Estudios previos en la vejiga urinaria han mostrado que inhibidores de las enzimas CSE y CBS disminuyen la síntesis endógena de H₂S, indicando así, una producción endógena de H₂S (Dombkowski *et al.*, 2006). En el presente estudio, la inmunohistoquímica reveló la presencia de una rica densidad de fibras inmunoreactivas para la proteína CSE y, en menor grado, para la CBS, que se correspondía con la distribución de fibras nerviosas a lo largo de la capa muscular lisa. Esto sugiere que su expresión en las terminaciones nerviosas podría estar involucrada en la síntesis de H₂S neuronal y, por consiguiente, en la regulación de la tensión de la musculatura lisa de la pared vesical. La alta densidad de fibras inmunoreactivas para la CSE encontradas en nervios intramurales está en consonancia con lo observado en el cuerpo cavernoso del hombre, en donde se ha identificado la expresión proteica de CSE esencialmente localizada en nervios periféricos distribuidos en las capas de músculo liso (d'Emmanuele di Villa Bianca *et al.*, 2009). Asimismo, nuestro estudio, revela la expresión de CSE y CSB en las proximidades de arteriolas que irrigan el cuello vesical, sugiriendo así, la participación del H₂S en la regulación del flujo sanguíneo local. Estos resultados son coincidentes con los previamente descritos en el uréter intravesical (Fernandes *et al.*, 2014a), reforzando así, el importante papel fisiológico del H₂S en la modulación del tono de la musculatura lisa visceral y vascular (Tang *et al.*, 2005; Lim *et al.*, 2008).

En el cuello de la vejiga urinaria, la liberación de NO inducida por la EET se produce en respuesta a bajas frecuencias de estimulación (0.2 – 1 Hz) (Hernández *et al.*, 2008). Así, con objeto de suprimir el componente neurogénico nitrérgico, se han utilizado frecuencias de estimulación por encima de 2 Hz. Además, las preparaciones fueron tratadas con L-NOARG, para inhibir la sintasa de NO, ya que estas condiciones son críticas a la hora de estudiar los efectos de neurotransmisores inhibidores independientes de NO en el cuello vesical (Martínez-Saénz *et al.*, 2011). Bajo dichas condiciones, la EET indujo una relajación dependiente de la frecuencia, la cual, fue abolida en presencia de TTX, indicando así, su carácter neurogénico. La incubación con PPG redujo ostensiblemente la relajación inducida por la EET. Sin embargo, el inhibidor de la CBS, AOAA, no modificó dicha respuesta. El hecho que el AOAA no modificara la relajación, es consistente con la baja densidad de fibras inmunoreactivas para la CBS, por lo que posiblemente dicha sintasa podría desempeñar un papel más relevante en procesos fisiopatológicos (Dombkowski *et al.*, 2006). Nuestros resultados indican que en el cuello de la vejiga, la liberación de H₂S neuronal, sintetizado por acción de la CSE, es responsable, en gran medida, de la neurotransmisión inhibidora NANC independiente de NO. El hecho que NO y H₂S neuronales sean liberados mayoritariamente en respuesta a bajas y altas frecuencias de estimulación, respectivamente, sugiere que dichos gases, liberados desde terminaciones nerviosas intramurales, desempeñarían un papel primordial en la relajación de la base de la vejiga urinaria, disminuyendo la resistencia del cuello vesical durante la fase de llenado. Asimismo, no se puede descartar la posible implicación de otros neurotransmisores y/o mediadores en la regulación de la contractilidad neurogénica del cuello vesical.

El donante GYY4137 es un compuesto que libera de forma lenta H₂S en medios acuosos *in vitro* e *in vivo* (Li *et al.*, 2008). En nuestro estudio, el GYY4137 produjo una potente relajación dependiente de la concentración. Dicho efecto es de inicio lento (5 a 6 min) y de largo recorrido manteniendo un efecto sostenido en un periodo aproximado de 30 min. Estos resultados están en consonancia con lo observado en diferentes lechos vasculares, en donde dicho agente libera H₂S de forma lenta y mantenida en el tiempo (Li *et al.*, 2008). En el cuello de la vejiga, el GYY4137 produjo un efecto relajante de una potencia incomparable con lo observado por el mismo compuesto en la aorta de la rata (pD₂=8.2 frente a 4)(Li *et al.*, 2008) o bien por otros donantes clásicos como el NaHS (d'Emmanuele di Villa Bianca *et al.*, 2009). La potencia relajante obtenida por el

donante de H₂S estaría relacionada con el tipo de tejido o con las dianas moleculares expresadas en los diferentes tejidos. Asimismo, el constrictor usado podría influenciar la potencia del efecto relajante (Wang, 2012). Sin embargo, el cuello de la vejiga es un tejido sensible a la estimulación en respuesta a la liberación endógena y la estimulación exógena del H₂S, desempeñando así un papel crucial en la regulación de la contractilidad del cuello vesical.

El efecto de la aplicación exógena de H₂S mimetiza el efecto inducido por la liberación de H₂S neuronal, en respuesta a un estímulo eléctrico. El hecho de que la respuesta relajante producida por el GYY4137 no se modificara como consecuencia de la inhibición farmacológica de las enzimas de síntesis, CSE y CBS o de los canales de N⁺ neuronales, sugiere que el H₂S induce relajación del músculo liso involucrando mecanismos postsinápticos.

En diferentes lechos vasculares se ha demostrado interacciones entre H₂S y NO para la regulación de la tensión de la musculatura lisa. Así, en la aorta de la rata, la relajación inducida por los donantes de H₂S, NaHS y GYY4137 es, en parte, mediado por la liberación de NO endotelial (Li *et al.*, 2008). En la presente investigación, tanto la relajación inducida por EET como por GYY4137 se ha llevado a cabo en preparaciones de músculo liso desprovistas de urotelio por lo que los resultados obtenidos claramente indican que la relajación sulfidráulica del cuello vesical se produce a través de mecanismos independientes del urotelio.

En el presente estudio, el H₂S es sintetizado por acción de la CSE. La vía de síntesis CSE/H₂S puede ser regulada por la actividad nitrérgica. La expresión y actividad de la CSE puede ser regulada por el NO (Barr & Calvert, 2014). Así, en la arteria aorta de la rata, el NO incrementa la expresión y la actividad de la CSE, aumentando la biodisponibilidad de H₂S endógeno (Zhao *et al.*, 2001). En el cuello de la vejiga urinaria, la llegada de potenciales de acción y la despolarización de la membrana neuronal favorece la entrada de Ca²⁺ extracelular al citosol que al formar el *Complejo Ca²⁺-calmodulina*, facilita la activación de las enzimas de síntesis de NO y H₂S, así como su liberación de las terminaciones nerviosas. Sin embargo, la relajación sulfidráulica del cuello de la vejiga es producida vía mecanismos independientes del NO ya que las relajaciones de H₂S se obtuvieron previo bloqueo de la sintasa de NO (Fernandes *et al.*, 2013b).

La relajación nitrérgica es producida vía mecanismos dependientes de la GCs/GMP (Hernández *et al.*, 2008). Al igual que la sintasa de NO neuronal y

endotelial, la actividad de la CSE es dependiente del *Complejo Ca²⁺-calmodulina* (Yang *et al.*, 2008; Wang, 2012). El H₂S sintetizado a partir de la L-cisteína por acción de la CSE, puede ejercer su función fisiológica a través de la sulfidación de proteínas de sus dianas moleculares. Este proceso podría aumentar la actividad de la GCs, conduciendo al incremento de las concentraciones intracelulares de GMPc y favoreciendo la relajación de la musculatura lisa (Mustafa *et al.*, 2009; Wang, 2012). Sin embargo, en nuestro estudio, el inhibidor de la GCs, ODQ no modificó la relajación inducida por el GYY4137. Esto junto con el hecho que el protocolo experimental fue desarrollado en presencia del L-NOARG, inhibidor de la sintasa de NO, sugiere que la relajación inducida por el H₂S se produce vía mecanismos independientes de la vía NO/GMPc. Estos resultados están de acuerdo con los observados en la musculatura lisa vascular en donde el H₂S produce vasodilatación a través de mecanismos independientes de la activación de la GCs (Kajimura *et al.*, 2010).

La implicación de la vía de la PKA en la relajación del cuello vesical ha sido previamente documentada. De hecho, la PKA está involucrada en la relajación inducida por la 5-HT (Recio *et al.*, 2009), el PACAP 38 y VIP (Hernández *et al.*, 2006a; Hernández *et al.*, 2006b) y por los inhibidores de la PDE4 (Ribeiro *et al.*, 2014c). En células endoteliales de la arteria pulmonar del cerdo, el H₂S inhibe la formación de aniones de superóxido a través de la vía AC/PKA (Muzaffar *et al.*, 2008). Debido a ello, hemos investigado si dicha vía estaría implicada en la relajación sulfidrgica. KT5720, un inhibidor selectivo de la PKA, no modificó la relajación inducida tanto por la EET como por el GYY4137, descartando así, la mediación de la vía AC/PKA en la relajación de H₂S en el cuello vesical.

En el músculo liso de la vejiga urinaria los canales de K⁺ desempeñan un importante papel en la repolarización del potencial de membrana y mantenimiento del potencial de reposo celular, limitando la amplitud y la duración de la contracción de la musculatura lisa (Brading & Brain, 2011; Petkov, 2012). El H₂S puede producir sulfidación del residuo de cisteína de canales de K⁺, modulando así, su actividad (Tang *et al.*, 2010). Por ello se ha estudiado la implicación de dichos canales en la relajación inducida por el H₂S. En preparaciones del cuello vesical contraídas con una SSF-K, el GYY4137 produjo una relajación reducida en comparación con el efecto obtenido en preparaciones precontraídas con FE. El incremento de las concentraciones de K⁺ extracelulares inhibe el flujo de este ión a través de los canales de K⁺ de la membrana muscular, por lo que una respuesta disminuida sugiere la participación de

dichos canales en la relajación del H₂S. Los canales K_{ATP} son la diana molecular por excelencia del H₂S en la musculatura lisa vascular (Tang *et al.*, 2005; Tang *et al.*, 2010). En la vejiga urinaria, la activación de canales K_{ATP} causa hiperpolarización de membrana muscular y relajación muscular (Petkov, 2012). En el presente estudio, la inhibición de canales K_{ATP} con glibenclamida, redujo la relajación inducida por la EET y el GYY4137, resultados que sugieren que el H₂S relaja el cuello vesical vía activación de canales K_{ATP}. El bloqueo de canales BK_{Ca}, SK_{Ca} e IK_{Ca} no modificó, en modo alguno, dicha respuesta descartando así la implicación de canales K_{Ca} en la relajación de H₂S. Sin embargo, la inhibición selectiva de canales K_V con 4-AP, incrementó la relajación inducida por la EET, resultados en consonancia con la presencia de canales K_V presinápticos moduladores de la liberación de transmisores inhibidores desde las terminaciones nerviosas en el cuello de la vejiga (Hernández *et al.*, 2008).

En el músculo liso vascular, el H₂S puede también modular la actividad de canales VOC tipo L. De hecho, la relajación inducida por el H₂S en la aorta (Zhao & Wang, 2002) y en los cardiomiocitos (Sun *et al.*, 2008) de la rata es dependiente de la regulación del influjo de Ca²⁺ extracelular por lo que donantes de H₂S podrían funcionar como inhibidores de canales VOC tipo L (Sun *et al.*, 2008). Por este motivo, investigamos si la relajación inducida por el GYY4137, además de involucrar la activación de canales K_{ATP}, podría tener un efecto inhibidor sobre el influjo de Ca²⁺ extracelular. Nuestros resultados sugieren que ambos mecanismos podrían estar involucrados dado que la precontracción de las preparaciones con SSF-K origina la despolarización de la membrana y la consecuente activación de canales VOC por lo que el H₂S podría inhibir dichos canales, disminuyendo así, el influjo de Ca²⁺ al citosol produciendo relajación de la musculatura lisa. El registro simultáneo de la tensión y Ca²⁺_i, mostró que el GYY4137 producía relajación de la musculatura lisa junto con pequeños descensos en la [Ca²⁺]_i, resultados que indicarían una escasa dependencia de mecanismos relacionados con el bloqueo de la entrada de Ca²⁺ extracelular en la relajación de H₂S.

Ya que la relajación inducida por el GYY4137 se producía independientemente de modificaciones en la [Ca²⁺]_i, mecanismos de desensibilización al Ca²⁺ podrían estar implicados en dicho efecto. La relajación del músculo liso sin cambios en las concentraciones citosólicas de Ca²⁺, es mediada a través de la desensibilización al Ca²⁺ de los miofilamentos contráctiles. La inhibición de la vía de la RhoA/RhoA cinasa, constituye uno de los más importantes mecanismos de desensibilización al Ca²⁺,

conduciendo a la activación de la MLCP (Somlyo & Somlyo, 2003). Los mecanismos de desensibilización al Ca^{2+} independientes de la MLCP, pueden, además, involucrar la fosforilación inhibidora de la MLCK por activación de la RhoK II dependiente del Complejo Ca^{2+} -calmodulina (Tansey *et al.*, 1994). Así, en la relajación inducida por el GYY4137, podrían estar implicados mecanismos de desensibilización al Ca^{2+} , involucrando, probablemente, la inhibición de una de estas cinasas. Estos resultados están de acuerdo con estudios realizados en el ratón que demuestran que donantes de H_2S inducen relajación del músculo liso gástrico y del colon, sin producir cambios significativos en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ debido a la regulación de la actividad de la MLCP por mecanismos dependientes (Dhaese & Lefebvre, 2009) e independientes (Dhaese *et al.*, 2010) de la Rho-cinasa.

En el detrusor de la rata, la liberación de neuropéptidos excitadores como la SP o la NKA, de nervios sensoriales en respuesta al H_2S produce contracción del músculo liso (Patacchini *et al.*, 2004). En el cuello de la vejiga, neuropéptidos sensoriales como el PACAP 38 (Hernández *et al.*, 2006b) y el CGRP (Martínez-Sáenz *et al.*, 2011), están involucrados en la neurotransmisión inhibidora NANC. Por ello, se ha investigado el papel de las APSC en la relajación sulfidrúrgica. La desensibilización funcional de las APSC con capsaicina, así como, el bloqueo de los receptores vaniloides con capsazepina redujo la respuesta relajante inducida por la EET y el GYY4137. Estos resultados sugieren que parte de la respuesta inducida por el H_2S en el cuello vesical, es debida a la liberación de neuropéptidos inhibidores desde las APSC. Además, canales TRP participan en la Fisiología del Tracto Urinario en respuesta a una amplia variedad de estímulos físicos y/o químicos (Avelino *et al.*, 2013). Los canales TRPA1 son reconocidos como la principal diana molecular del H_2S (Ogawa *et al.*, 2012). En el presente estudio, HC030031 y AMG9810, bloqueantes de los canales TRPA1 y TRPV1, respectivamente, redujeron la relajación de H_2S , sugiriendo así, la implicación de dichos canales. El hecho que la inhibición de la relajación en respuesta a la EET y al GYY4137 sea de menor magnitud a la observada en presencia de capsaicina sugiere que otros canales iónicos de aferentes sensoriales podrían estar involucrados en la relajación sulfidrúrgica.

La reducción de la relajación inducida por la EET y el GYY4137 en presencia de los antagonistas de los receptores VIP/PACAP y CGRP, sugiere parte de la acción del H_2S es producida vía liberación de dichos péptidos desde las APSC.

La vía de las COXs desempeña un papel trascendental en la Fisiología y Fisiopatología del Tracto Urinario Inferior. Durante la fase de llenado, la vejiga urinaria presenta contracciones y relajaciones espontáneas producidas por una actividad miogénica basal, la cual puede ser incrementada como consecuencia de la liberación local de prostanoïdes derivados de la COX (de Jongh *et al.*, 2007). Dichas contracciones pueden incrementar la actividad de nervios aferentes, favoreciendo aún más el incremento de la contractilidad de la pared vesical contribuyendo al desarrollo de la hiperactividad del detrusor (Andersson, 2010). En la vejiga de la rata, la activación de canales TRPV1 facilita la liberación de prostanoïdes derivados de las COXs desde APSC (Andrade *et al.*, 2006). En el cuello vesical, prostanoïdes derivados de la COX-1 están involucrados en la regulación del tono muscular mediado por receptores bradicinérgicos (Ribeiro *et al.*, 2014b). Asimismo, parte de la relajación neurogénica NANC independiente de NO es mediada por prostanoïdes derivados de la COX-1 (Martínez-Saénz *et al.*, 2011). Por ello, en el presente estudio se investigó el papel de la vía de las COX en la relajación inducida por el H₂S. La indometacina, así como, el SC560, inhibidores de la COX y COX-1, respectivamente, disminuyeron el efecto inducido por la EET y el GYY4137, lo que sugiere que prostanoïdes derivados de la COX-1 estarían involucrados en la relajación sulfidrérgica en el cuello de la vejiga.

El presente estudio proporciona evidencias funcionales del papel del H₂S como molécula de señalización gaseosa involucrada en la relajación neurogénica NANC e independiente de NO. El H₂S relaja el músculo liso del cuello vesical vía activación de canales K_{ATP} y mecanismos de desensibilización al Ca²⁺, involucrando además, en menor proporción, inhibición de la entrada de Ca²⁺ extracelular. Asimismo, el H₂S facilita la liberación de neuropéptidos inhibidores, PACAP 38 o CGRP, y prostanoïdes derivados de la COX-1 desde APSC a través de la activación de canales TRPA1 y TRPV1 o/y otros canales iónicos de nervios sensoriales (Figura 18).

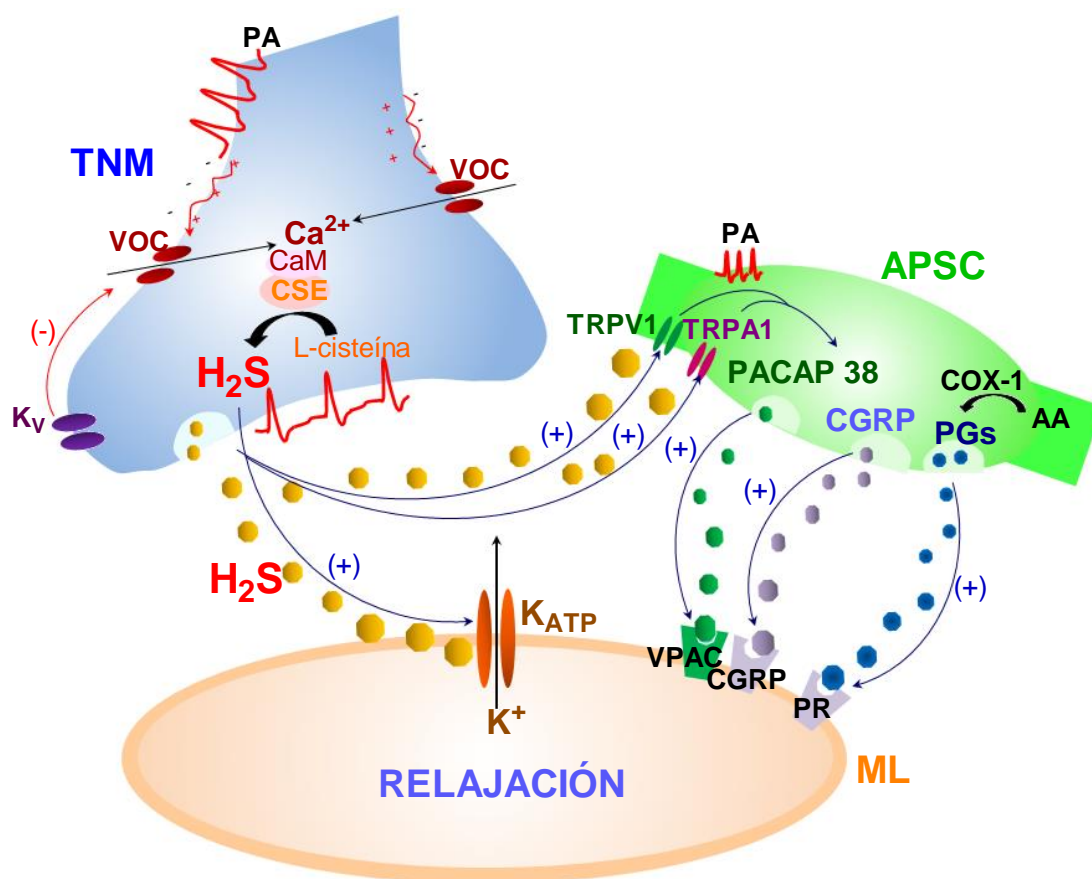


Figura 18. Esquema propuesto del mecanismo de señalización sulfidráulica en el uréter intravesical y cuello de la vejiga urinaria. La llegada de potenciales de acción (PA) despolariza la membrana celular de las terminaciones nerviosas motoras (TNM) uretrales y vesicales que incrementa el influxo de Ca^{2+} extracelular a través de la activación de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (VOC). El Ca^{2+} se acopla a la calmodulina formando el Complejo Ca^{2+} -calmodulina (CaM) que a su vez incrementa la actividad de la cistationina- γ -liasa (CSE) favoreciendo la síntesis y la liberación de H_2S neuronal. El H_2S se difunde a través de la membrana produciendo la activación de los canales K_{ATP} de la membrana de la célula muscular produciendo hiperpolarización de la misma y relajación del músculo liso (ML). Asimismo, el H_2S promueve la activación de canales TRPA1 y TRPV1 de aferentes primarias sensibles a capsaicina (APSC), favoreciendo la liberación de neuropéptidos inhibidores PACAP 38 y CGRP , en el uréter intravesical y el cuello vesical. En el cuello de la vejiga también se liberan prostanoideos (PGs) relajantes desde las APSC.

VI. CONCLUSIONES

En el presente estudio se ha investigado el papel del sulfuro de hidrógeno en la neurotransmisión inhibitoria del uréter intravesical y el cuello vesical del cerdo. Del conjunto de estos resultados podemos concluir:

1. El sulfuro de hidrógeno, sintetizado en fibras nerviosas motoras por acción de la cistationina γ -liasa, actúa, junto con el óxido nítrico, como molécula señalizadora en la neurotransmisión inhibitoria no adrenérgica no colinérgica en el uréter intravesical y el cuello vesical.
2. En el uréter intravesical, el sulfuro de hidrógeno produce una potente relajación de la musculatura lisa ureteral vía activación de canales K_{ATP} de membrana de la célula muscular y canales TRPA1 y TRPV1, localizados en las aferentes primarias sensibles a capsaicina, favoreciendo la liberación de los neuropéptidos inhibidores PACAP 38 y CGRP.
3. En el cuello de la vejiga urinaria, el sulfuro de hidrógeno produce relajación del cuello vesical involucrando la participación de canales K_{ATP} y mecanismos dependientes de la desensibilización del calcio intracelular. Asimismo, dicha acción es producida indirectamente a través de la liberación de PACAP 38, CGRP y prostanoïdes desde las aferentes primarias sensibles a capsaicina vía activación de canales TRPA1 y TRPV1.
4. Donantes de sulfuro de hidrógeno y activadores de canales K_{ATP} podrían ser de utilidad terapéutica para el tratamiento de la obstrucción ureteral producida por la presencia de calculo ureterales y de los Síntomas del Tracto Urinario Inferior asociados a cuadros obstructivos secundarios a la hiperplasia benigna de la próstata.
5. **Como conclusión final**, el sulfuro de hidrógeno produce, tanto en el uréter como en el cuello de la vejiga, una acción directa sobre el canal K_{ATP} de la membrana de la célula muscular y una liberación de neuropéptidos inhibidores sensoriales. En el cuello de la vejiga se produce, asimismo, la liberación de prostanoïdes relajantes derivados de la ciclooxigenasa-1 desde dichas aferentes.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Abrams P, Cardozo L, Fall M, Griffiths D, Rosier P, Ulmsten U, van Kerrebroeck P, Victor A & Wein A. (2002). The standardisation of terminology of lower urinary tract function: report from the Standardisation Sub-committee of the International Continence Society. *Am J Obstet Gynecol* **187**, 116-126.
- Afeli SA & Petkov GV. (2013). Functional BK channels facilitate the β_3 -adrenoceptor agonist-mediated relaxation of nerve-evoked contractions in rat urinary bladder smooth muscle isolated strips. *Eur J Pharmacol* **711**, 50-56.
- Afeli SA, Rovner ES & Petkov GV. (2012). SK but not IK channels regulate human detrusor smooth muscle spontaneous and nerve-evoked contractions. *Am J Physiol Renal Physiol* **303**, F559-568.
- Ali MY, Ping CY, Mok YY, Ling L, Whiteman M, Bhatia M & Moore PK. (2006). Regulation of vascular nitric oxide in vitro and in vivo; a new role for endogenous hydrogen sulphide? *Br J Pharmacol* **149**, 625-634.
- Andersson KE. (2007). LUTS treatment: future treatment options. *Neurourol Urodyn* **26**, 934-947.
- Andersson KE. (2010). Detrusor myocyte activity and afferent signaling. *Neurourol Urodyn* **29**, 97-106.
- Andersson KE. (2011). Muscarinic acetylcholine receptors in the urinary tract. *Handb Exp Pharmacol*, 319-344.
- Andersson KE & Arner A. (2004). Urinary bladder contraction and relaxation: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* **84**, 935-986.
- Andersson KE & Wein AJ. (2004). Pharmacology of the lower urinary tract: basis for current and future treatments of urinary incontinence. *Pharmacol Rev* **56**, 581-631.
- Andrade EL, Ferreira J, André E & Calixto JB. (2006). Contractile mechanisms coupled to TRPA1 receptor activation in rat urinary bladder. *Biochem Pharmacol* **72**, 104-114.
- Apodaca G, Balestreire E & Birder LA. (2007). The uroepithelial-associated sensory web. *Kidney Int* **72**, 1057-1064.
- Arms L & Vizzard MA. (2011). Neuropeptides in lower urinary tract function. *Handb Exp Pharmacol*, 395-423.
- Arteaga JL, Orensanz LM, Martínez MP, Barahona MV, Martínez-Sáenz A, Fernandes VS, Bustamante S, Carballido J, Benedito S, García-Sacristán A, Prieto D & Hernández M. (2012a). Endothelin ET_B receptors are involved in the relaxation to the pig urinary bladder neck. *Neurourol Urodyn* **31**, 688-694.
- Arteaga JL, Orensanz LM, Martínez MP, Barahona MV, Recio P, Martínez-Sáenz A, Fernandes VS, Ribeiro AS, García-Sacristán A, Prieto D & Hernández M. (2012b). Mechanisms involved in endothelin-1-induced contraction of the pig urinary bladder neck. *Neurourol Urodyn* **31**, 156-161.

- Austgen JR, Hermann GE, Dantzer HA, Rogers RC & Kline DD. (2011). Hydrogen sulfide augments synaptic neurotransmission in the nucleus of the solitary tract. *J Neurophysiol* **106**, 1822-1832.
- Avelino A, Charrua A, Frias B, Cruz C, Boudes M, de Ridder D & Cruz F. (2013). Transient receptor potential channels in bladder function. *Acta Physiol (Oxf)* **207**, 110-122.
- Avelino A & Cruz F. (2006). TRPV1 (vanilloid receptor) in the urinary tract: expression, function and clinical applications. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **373**, 287-299.
- Aydin M, Wang HZ, Zhang X, Chua R, Downing K, Melman A & DiSanto ME. (2012). Large-conductance calcium-activated potassium channel activity, as determined by whole-cell patch clamp recording, is decreased in urinary bladder smooth muscle cells from male rats with partial urethral obstruction. *BJU Int* **110**, E402-408.
- Baek M & Kim KD. (2013). Current surgical management of vesicoureteral reflux. *Korean J Urol* **54**, 732-737.
- Baker SA, Hatton WJ, Han J, Hennig GW, Britton FC & Koh SD. (2010). Role of TREK-1 potassium channel in bladder overactivity after partial bladder outlet obstruction in mouse. *J Urol* **183**, 793-800.
- Barr LA & Calvert JW. (2014). Discoveries of hydrogen sulfide as a novel cardiovascular therapeutic. *Circ J* **78**, 2111-2118.
- Beckel JM, Kanai A, Lee SJ, de Groat WC & Birder LA. (2006). Expression of functional nicotinic acetylcholine receptors in rat urinary bladder epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* **290**, F103-110.
- Bedoya-Ronga A & Currie I. (2014). Improving the management of urinary incontinence. *Practitioner* **258**, 21-24, 22-23.
- Berridge MJ, Bootman MD & Roderick HL. (2003). Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 517-529.
- Bełtowski J & Jamroz-Wiśniewska A. (2014). Hydrogen sulfide and endothelium-dependent vasorelaxation. *Molecules* **19**, 21183-21199.
- Birder L & Andersson KE. (2013). Urothelial signaling. *Physiol Rev* **93**, 653-680.
- Birder L, de Groat W, Mills I, Morrison J, Thor K & Drake M. (2010). Neural control of the lower urinary tract: peripheral and spinal mechanisms. *Neurourol Urodyn* **29**, 128-139.
- Birder LA. (2001). Involvement of the urinary bladder urothelium in signaling in the lower urinary tract. *Proc West Pharmacol Soc* **44**, 85-86.
- Birder LA. (2006). Urinary bladder urothelium: molecular sensors of chemical/thermal/mechanical stimuli. *Vascul Pharmacol* **45**, 221-226.

Birder LA & de Groat WC. (2007). Mechanisms of disease: involvement of the urothelium in bladder dysfunction. *Nat Clin Pract Urol* **4**, 46-54.

Birder LA, Nealen ML, Kiss S, de Groat WC, Caterina MJ, Wang E, Apodaca G & Kanai AJ. (2002). Beta-adrenoceptor agonists stimulate endothelial nitric oxide synthase in rat urinary bladder urothelial cells. *J Neurosci* **22**, 8063-8070.

Bonev AD & Nelson MT. (1993). Muscarinic inhibition of ATP-sensitive K⁺ channels by protein kinase C in urinary bladder smooth muscle. *Am J Physiol* **265**, C1723-1728.

Borisova L, Shmygol A, Wray S & Burdyga T. (2007). Evidence that a Ca²⁺ sparks/STOCs coupling mechanism is responsible for the inhibitory effect of caffeine on electro-mechanical coupling in guinea pig ureteric smooth muscle. *Cell Calcium* **42**, 303-311.

Brading AF. (1992). Ion channels and control of contractile activity in urinary bladder smooth muscle. *Jpn J Pharmacol* **58 Suppl 2**, 120P-127P.

Brading AF. (2006). Spontaneous activity of lower urinary tract smooth muscles: correlation between ion channels and tissue function. *J Physiol* **570**, 13-22.

Brading AF & Brain KL. (2011). Ion channel modulators and urinary tract function. *Handb Exp Pharmacol*, 375-393.

Brading AF & McCloskey KD. (2005). Mechanisms of Disease: specialized interstitial cells of the urinary tract--an assessment of current knowledge. *Nat Clin Pract Urol* **2**, 546-554.

Braverman AS, Tibb AS & Ruggieri MR. (2006). M₂ and M₃ muscarinic receptor activation of urinary bladder contractile signal transduction. I. Normal rat bladder. *J Pharmacol Exp Ther* **316**, 869-874.

Buckner SA, Milicic I, Daza AV, Coghlan MJ & Gopalakrishnan M. (2002). Spontaneous phasic activity of the pig urinary bladder smooth muscle: characteristics and sensitivity to potassium channel modulators. *Br J Pharmacol* **135**, 639-648.

Burcher E, Zeng XP, Strigas J, Shang F, Millard RJ & Moore KH. (2000). Autoradiographic localization of tachykinin and calcitonin gene-related peptide receptors in adult urinary bladder. *J Urol* **163**, 331-337.

Burdyga T & Wray S. (2005). Action potential refractory period in ureter smooth muscle is set by Ca sparks and BK channels. *Nature* **436**, 559-562.

Burnstock G. (2011). Introductory overview of purinergic signalling. *Front Biosci (Elite Ed)* **3**, 896-900.

Bustamante S, Orensanz LM, Barahona MV, Contreras J, García-Sacristán A & Hernández M. (2000). Tachykininergic excitatory neurotransmission in the pig intravesical ureter. *J Urol* **164**, 1371-1375.

- Bustamante S, Orensanz LM, Barahona MV, García-Sacristán A & Hernández M. (2001). NK₂ tachykinin receptors mediate contraction of the pig intravesical ureter: tachykinin-induced enhancement of non-adrenergic non-cholinergic excitatory neurotransmission. *Neurourol Urodyn* **20**, 297-308.
- Bustamante S, Orensanz LM, Recio P, Carballido J, García-Sacristán A, Prieto D & Hernández M. (2010). Functional evidence of nitrenergic neurotransmission in the human urinary bladder neck. *Neurosci Lett* **477**, 91-94.
- Calvert RC, Thompson CS & Burnstock G. (2008). ATP release from the human ureter on distension and P2X₃ receptor expression on suburothelial sensory nerves. *Purinergic Signal* **4**, 377-381.
- Canda AE, Turna B, Cinar GM & Nazli O. (2007). Physiology and pharmacology of the human ureter: basis for current and future treatments. *Urol Int* **78**, 289-298.
- Castro-Piedras I & Perez-Zoghbi JF. (2013). Hydrogen sulphide inhibits Ca²⁺ release through InsP₃ receptors and relaxes airway smooth muscle. *J Physiol* **591**, 5999-6015.
- Celik O, Ipekci T, Aydogdu O & Yucel S. (2014). Current medical diagnosis and management of vesicoureteral reflux in children. *Nephrourol Mon* **6**, e13534.
- Chaparro LP, Maroto JR & López CL. (2002). Conocimientos actualizados sobre fisiopatología de la obstrucción de la unión pieloureteral. *Clínicas Urológicas de la Complutense* **9**, 13-27.
- Chapple CR, Yamanishi T & Chess-Williams R. (2002). Muscarinic receptor subtypes and management of the overactive bladder. *Urology* **60**, 82-88; discussion 88-89.
- Charrua A, Reguenga C, Cordeiro JM, Correia-de-Sá P, Paule C, Nagy I, Cruz F & Avelino A. (2009). Functional transient receptor potential vanilloid 1 is expressed in human urothelial cells. *J Urol* **182**, 2944-2950.
- Cheng Y, Ndisang JF, Tang G, Cao K & Wang R. (2004). Hydrogen sulfide-induced relaxation of resistance mesenteric artery beds of rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **287**, H2316-2323.
- Chess-Williams R. (2002). Muscarinic receptors of the urinary bladder: detrusor, urothelial and prejunctional. *Auton Autacoid Pharmacol* **22**, 133-145.
- Chitnis MK, Njie-Mbye YF, Opere CA, Wood ME, Whiteman M & Ohia SE. (2013). Pharmacological actions of the slow release hydrogen sulfide donor GYY4137 on phenylephrine-induced tone in isolated bovine ciliary artery. *Exp Eye Res* **116**, 350-354.
- Chopra B, Barrick SR, Meyers S, Beckel JM, Zeidel ML, Ford AP, de Groat WC & Birder LA. (2005). Expression and function of bradykinin B₁ and B₂ receptors in normal and inflamed rat urinary bladder urothelium. *J Physiol* **562**, 859-871.
- Chow KY, Wu C, Sui GP & Fry CH. (2003). Role of the T-type Ca²⁺ current on the contractile performance of guinea pig detrusor smooth muscle. *Neurourol Urodyn* **22**, 77-82.

- Chung DE & Kaplan SA. (2010). Current role for combination therapy in male LUTS. *Arch Esp Urol* **63**, 323-332.
- Coletta C, Papapetropoulos A, Erdelyi K, Olah G, Módos K, Panopoulos P, Asimakopoulou A, Gerö D, Sharina I, Martin E & Szabo C. (2012). Hydrogen sulfide and nitric oxide are mutually dependent in the regulation of angiogenesis and endothelium-dependent vasorelaxation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 9161-9166.
- d'Emmanuele di Villa Bianca R, Sorrentino R, Maffia P, Mirone V, Imbimbo C, Fusco F, De Palma R, Ignarro LJ & Cirino G. (2009). Hydrogen sulfide as a mediator of human corpus cavernosum smooth-muscle relaxation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 4513-4518.
- de Groat WC & Wickens C. (2013). Organization of the neural switching circuitry underlying reflex micturition. *Acta Physiol (Oxf)* **207**, 66-84.
- de Groat WC & Yoshimura N. (2009). Afferent nerve regulation of bladder function in health and disease. *Handb Exp Pharmacol*, 91-138.
- de Jongh R, van Koeveringe GA, van Kerrebroeck PE, Markerink-van Ittersum M, de Vente J & Gillespie JI. (2007). The effects of exogenous prostaglandins and the identification of constitutive cyclooxygenase I and II immunoreactivity in the normal guinea pig bladder. *BJU Int* **100**, 419-429.
- Desgrandchamps F, Moulinier F, Cochand-Priollet B, Wassef M, Teillac P & Le Duc A. (1997). Microscopic study of the pig ureteral urothelium. *J Urol* **157**, 1926-1927.
- Dhaese I & Lefebvre RA. (2009). Myosin light chain phosphatase activation is involved in the hydrogen sulfide-induced relaxation in mouse gastric fundus. *Eur J Pharmacol* **606**, 180-186.
- Dhaese I, Van Colen I & Lefebvre RA. (2010). Mechanisms of action of hydrogen sulfide in relaxation of mouse distal colonic smooth muscle. *Eur J Pharmacol* **628**, 179-186.
- Ding HL, Ryder JW, Stull JT & Kamm KE. (2009). Signaling processes for initiating smooth muscle contraction upon neural stimulation. *J Biol Chem* **284**, 15541-15548.
- Dingwall L. (2008). Promoting effective continence care for older people: a literature review. *Br J Nurs* **17**, 166-172.
- Dombkowski RA, Doellman MM, Head SK & Olson KR. (2006). Hydrogen sulfide mediates hypoxia-induced relaxation of trout urinary bladder smooth muscle. *J Exp Biol* **209**, 3234-3240.
- Dombkowski RA, Russell MJ, Schulman AA, Doellman MM & Olson KR. (2005). Vertebrate phylogeny of hydrogen sulfide vasoactivity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **288**, R243-252.
- Donoso MV, Salas C, Sepúlveda G, Lewin J, Fournier A & Huidobro-Toro JP. (1994). Involvement of ET_A receptors in the facilitation by endothelin-1 of non-adrenergic non-cholinergic transmission in the rat urinary bladder. *Br J Pharmacol* **111**, 473-482.

- Drake RL, Vogl W & Mitchell AW. (2010). *Gray's - Anatomía para estudiantes*. Barcelona.
- Drumm BT, Koh SD, Andersson KE & Ward SM. (2014). Calcium signalling in Cajal-like interstitial cells of the lower urinary tract. *Nat Rev Urol* **11**, 555-564.
- Edyvane KA, Trussell DC, Jonavicius J, Henwood A & Marshall VR. (1992). Presence and regional variation in peptide-containing nerves in the human ureter. *J Auton Nerv Syst* **39**, 127-137.
- Felsen D, Dardashti K, Ostad M, Lemer ML, Gross SS, Chen J, Vaughan ED & Poppas DP. (2003). Inducible nitric oxide synthase promotes pathophysiological consequences of experimental bladder outlet obstruction. *J Urol* **169**, 1569-1572.
- Fernandes VS, Barahona MV, Recio P, Martínez-Sáenz A, Ribeiro AS, Contreras C, Martínez AC, Bustamante S, Carballido J, García-Sacristán A, Prieto D & Hernández M. (2012). Mechanisms involved in testosterone-induced relaxation to the pig urinary bladder neck. *Steroids* **77**, 394-402.
- Fernandes VS, Ribeiro AS, Barahona MV, Orensanz LM, Martínez-Sáenz A, Recio P, Martínez AC, Bustamante S, Carballido J, García-Sacristán A, Prieto D & Hernández M. (2013a). Hydrogen sulfide mediated inhibitory neurotransmission to the pig bladder neck: role of K_{ATP} channels, sensory nerves and calcium signaling. *J Urol* **190**, 746-756.
- Fernandes VS, Ribeiro AS, Martínez MP, Orensanz LM, Barahona MV, Martínez-Sáenz A, Recio P, Benedito S, Bustamante S, Carballido J, García-Sacristán A, Prieto D & Hernández M. (2013b). Endogenous hydrogen sulfide has a powerful role in inhibitory neurotransmission to the pig bladder neck. *J Urol* **189**, 1567-1573.
- Fernandes VS, Ribeiro AS, Martínez P, López-Oliva ME, Barahona MV, Orensanz LM, Martínez-Sáenz A, Recio P, Benedito S, Bustamante S, García-Sacristán A, Prieto D & Hernández M. (2014a). Hydrogen sulfide plays a key role in the inhibitory neurotransmission to the pig intravesical ureter. *PLoS One* **9**, e113580.
- Fernandes VS, Ribeiro AS, Martínez-Sáenz A, Blaha I, Serrano-Margüello D, Recio P, Martínez AC, Bustamante S, Vázquez-Alba D, Carballido J, García-Sacristán A & Hernández M. (2014b). Underlying mechanisms involved in progesterone-induced relaxation to the pig bladder neck. *Eur J Pharmacol* **723**, 246-252.
- Forner S, Andrade EL, Martini AC, Bento AF, Medeiros R, Koepp J & Calixto JB. (2012). Effects of kinin B₁ and B₂ receptor antagonists on overactive urinary bladder syndrome induced by spinal cord injury in rats. *Br J Pharmacol* **167**, 1737-1752.
- Fowler CJ, Griffiths D & de Groat WC. (2008). The neural control of micturition. *Nat Rev Neurosci* **9**, 453-466.
- Fry CH, Skennerton D, Wood D & Wu C. (2002). The cellular basis of contraction in human detrusor smooth muscle from patients with stable and unstable bladders. *Urology* **59**, 3-12.

- Fry CH, Wu C & Sui GP. (1998). Electrophysiological properties of the bladder. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* **9**, 291-298.
- Fujishige A, Takahashi K & Tsuchiya T. (2002). Altered mechanical properties in smooth muscle of mice with a mutated calponin locus. *Zoolog Sci* **19**, 167-174.
- Fusco F, di Villa Bianca R, Mitidieri E, Cirino G, Sorrentino R & Mirone V. (2012). Sildenafil effect on the human bladder involves the L-cysteine/hydrogen sulfide pathway: a novel mechanism of action of phosphodiesterase type 5 inhibitors. *Eur Urol* **62**, 1174-1180.
- Gai JW, Wahafu W, Guo H, Liu M, Wang XC, Xiao YX, Zhang L, Xin ZC & Jin J. (2013). Further evidence of endogenous hydrogen sulphide as a mediator of relaxation in human and rat bladder. *Asian J Androl* **15**, 692-696.
- Gallego D, Clavé P, Donovan J, Rahmati R, Grundy D, Jiménez M & Beyak MJ. (2008). The gaseous mediator, hydrogen sulphide, inhibits in vitro motor patterns in the human, rat and mouse colon and jejunum. *Neurogastroenterol Motil* **20**, 1306-1316.
- Giglio D, Delbro DS & Tobin G. (2001). On the functional role of muscarinic M₂ receptors in cholinergic and purinergic responses in the rat urinary bladder. *Eur J Pharmacol* **428**, 357-364.
- Gil V, Gallego D & Jiménez M. (2011). Effects of inhibitors of hydrogen sulphide synthesis on rat colonic motility. *Br J Pharmacol* **164**, 485-498.
- Gong MC, Fujihara H, Somlyo AV & Somlyo AP. (1997). Translocation of *rhoA* associated with Ca²⁺ sensitization of smooth muscle. *J Biol Chem* **272**, 10704-10709.
- Gratzke C, Streng T, Waldkirch E, Sigl K, Stief C, Andersson KE & Hedlund P. (2009). Transient receptor potential A1 (TRPA1) activity in the human urethra--evidence for a functional role for TRPA1 in the outflow region. *Eur Urol* **55**, 696-704.
- Grol S, van Koevinge GA, de Vente J, van Kerrebroeck PE & Gillespie JI. (2008). Regional differences in sensory innervation and suburothelial interstitial cells in the bladder neck and urethra. *BJU Int* **102**, 870-877.
- Guo W, Cheng ZY & Zhu YZ. (2013). Hydrogen sulfide and translational medicine. *Acta Pharmacol Sin* **34**, 1284-1291.
- Gutman GA, Chandy KG, Adelman JP, Aiyar J, Bayliss DA, Clapham DE, Covarriubias M, Desir GV, Furuichi K, Ganetzky B, Garcia ML, Grissmer S, Jan LY, Karschin A, Kim D, Kuperschmidt S, Kurachi Y, Lazdunski M, Lesage F, Lester HA, McKinnon D, Nichols CG, O'Kelly I, Robbins J, Robertson GA, Rudy B, Sanguinetti M, Seino S, Stuehmer W, Tamkun MM, Vandenberg CA, Wei A, Wulff H, Wymore RS & Pharmacology IUo. (2003). International Union of Pharmacology. XLI. Compendium of voltage-gated ion channels: potassium channels. *Pharmacol Rev* **55**, 583-586.
- Han YF, Huang X, Guo X, Wu YS, Liu DH, Lu HL, Kim YC & Xu WX. (2011). Evidence that endogenous hydrogen sulfide exerts an excitatory effect on gastric motility in mice. *Eur J Pharmacol* **673**, 85-95.

- Hanna-Mitchell AT, Beckel JM, Barbadora S, Kanai AJ, de Groat WC & Birdier LA. (2007). Non-neuronal acetylcholine and urinary bladder urothelium. *Life Sci* **80**, 2298-2302.
- Harvey RA, Skennerton DE, Newgreen D & Fry CH. (2002). The contractile potency of adenosine triphosphate and ecto-adenosine triphosphatase activity in guinea pig detrusor and detrusor from patients with a stable, unstable or obstructed bladder. *J Urol* **168**, 1235-1239.
- Hashitani H & Brading AF. (2003). Electrical properties of detrusor smooth muscles from the pig and human urinary bladder. *Br J Pharmacol* **140**, 146-158.
- Hashitani H, Brading AF & Suzuki H. (2004). Correlation between spontaneous electrical, calcium and mechanical activity in detrusor smooth muscle of the guinea-pig bladder. *Br J Pharmacol* **141**, 183-193.
- Hawrylyshyn KA, Michelotti GA, Cogé F, Guénin SP & Schwinn DA. (2004). Update on human α_1 -adrenoceptor subtype signaling and genomic organization. *Trends Pharmacol Sci* **25**, 449-455.
- Hedegaard ER, Nielsen BD, Kun A, Hughes AD, Krøigaard C, Mogensen S, Matchkov VV, Frøbert O & Simonsen U. (2014). Kv7 channels are involved in hypoxia-induced vasodilatation of porcine coronary arteries. *Br J Pharmacol* **171**, 69-82.
- Hegde SS. (2006). Muscarinic receptors in the bladder: from basic research to therapeutics. *Br J Pharmacol* **147 Suppl 2**, S80-87.
- Hernández M, Barahona MV, Bustamante S, García-Sacristán A & Orensanz LM. (1999). A_{2B} adenosine receptors mediate relaxation of the pig intravesical ureter: adenosine modulation of non adrenergic non cholinergic excitatory neurotransmission. *Br J Pharmacol* **126**, 969-978.
- Hernández M, Barahona MV, Recio P, Benedito S, Martínez AC, Rivera L, García-Sacristán A, Prieto D & Orensanz LM. (2006a). Neuronal and smooth muscle receptors involved in the PACAP- and VIP-induced relaxations of the pig urinary bladder neck. *Br J Pharmacol* **149**, 100-109.
- Hernández M, Barahona MV, Recio P, Bustamante S, Benedito S, Rivera L, García-Sacristán A, Prieto D & Orensanz LM. (2006b). PACAP 38 is involved in the non-adrenergic non-cholinergic inhibitory neurotransmission in the pig urinary bladder neck. *Neurourol Urodyn* **25**, 490-497.
- Hernández M, Barahona MV, Recio P, Navarro-Dorado J, Bustamante S, Benedito S, García-Sacristán A, Prieto D & Orensanz LM. (2008). Role of neuronal voltage-gated K⁺ channels in the modulation of the nitrergic neurotransmission of the pig urinary bladder neck. *Br J Pharmacol* **153**, 1251-1258.
- Hernández M, Barahona MV, Recio P, Rivera L, Benedito S, Martínez AC, García-Sacristán A, Orensanz LM & Prieto D. (2004). Heterogeneity of neuronal and smooth muscle receptors involved in the VIP- and PACAP-induced relaxations of the pig intravesical ureter. *Br J Pharmacol* **141**, 123-131.
- Hernández M & Bustamante S. (2010). Bases Neuroanatómicas y Neurofisiológicas de la vejiga urinaria. In *Compendio de la vejiga neurógena traumática*, 1 edn. Astra Tech S.A., Barcelona.

- Hernández M, Knight GE, Wildman SS & Burnstock G. (2009). Role of ATP and related purines in inhibitory neurotransmission to the pig urinary bladder neck. *Br J Pharmacol* **157**, 1463-1473.
- Hernández M, Prieto D, Orensanz LM, Barahona MV, García-Sacristán A & Simonsen U. (1995). Nitric oxide is involved in the non-adrenergic, non-cholinergic inhibitory neurotransmission of the pig intravesical ureter. *Neurosci Lett* **186**, 33-36.
- Hernández M, Prieto D, Orensanz LM, Barahona MV, Jiménez-Cidre M, Rivera L, García-Sacristán A & Simonsen U. (1997). Involvement of a glibenclamide-sensitive mechanism in the nitrergic neurotransmission of the pig intravesical ureter. *Br J Pharmacol* **120**, 609-616.
- Hernández M, Prieto D, Simonsen U, Rivera L, Barahona MV & García-Sacristán A. (1992). Noradrenaline modulates smooth muscle activity of the isolated intravesical ureter of the pig through different types of adrenoceptors. *Br J Pharmacol* **107**, 924-931.
- Hernández M, Recio P, Barahona MV, Bustamante S, Peña L, Martínez AC, García-Sacristán A, Prieto D & Orensanz LM. (2007). Pre-junctional α_2 -adrenoceptors modulation of the nitrergic transmission in the pig urinary bladder neck. *Neurourol Urodyn* **26**, 578-583.
- Hernández M, Simonsen U, Prieto D, Rivera L, García P, Ordaz E & García-Sacristán A. (1993). Different muscarinic receptor subtypes mediating the phasic activity and basal tone of pig isolated intravesical ureter. *Br J Pharmacol* **110**, 1413-1420.
- Herrera GM, Heppner TJ & Nelson MT. (2001). Voltage dependence of the coupling of Ca^{2+} sparks to BK_{Ca} channels in urinary bladder smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* **280**, C481-490.
- Hofmann F, Ammendola A & Schlossmann J. (2000). Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases. *J Cell Sci* **113** (Pt 10), 1671-1676.
- Hollingsworth JM, Rogers MA, Kaufman SR, Bradford TJ, Saint S, Wei JT & Hollenbeck BK. (2006). Medical therapy to facilitate urinary stone passage: a meta-analysis. *Lancet* **368**, 1171-1179.
- Hosoki R, Matsuki N & Kimura H. (1997). The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* **237**, 527-531.
- Hristov KL, Chen M, Afeli SA, Cheng Q, Rovner ES & Petkov GV. (2012). Expression and function of $\text{Kv}2$ -containing channels in human urinary bladder smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* **302**, C1599-1608.
- Huang J, Luo YL, Hao Y, Zhang YL, Chen PX, Xu JW, Chen MH, Luo YF, Zhong NS, Xu J & Zhou WL. (2014). Cellular mechanism underlying hydrogen sulfide induced mouse tracheal smooth muscle relaxation: role of BK_{Ca} . *Eur J Pharmacol* **741**, 55-63.
- Huang X, Meng XM, Liu DH, Wu YS, Guo X, Lu HL, Zhuang XY, Kim YC & Xu WX. (2013). Different regulatory effects of hydrogen sulfide and nitric oxide on gastric motility in mice. *Eur J Pharmacol* **720**, 276-285.

- Hudman D, Elliott RA & Norman RI. (2000). K_{ATP} channels mediate the β_2 -adrenoceptor agonist-induced relaxation of rat detrusor muscle. *Eur J Pharmacol* **397**, 169-176.
- Hunnskaar S, Lose G, Sykes D & Voss S. (2004). The prevalence of urinary incontinence in women in four European countries. *BJU Int* **93**, 324-330.
- Ikedo Y, Fry C, Hayashi F, Stolz D, Griffiths D & Kanai A. (2007). Role of gap junctions in spontaneous activity of the rat bladder. *Am J Physiol Renal Physiol* **293**, F1018-1025.
- Imaizumi Y, Muraki K & Watanabe M. (1990). Characteristics of transient outward currents in single smooth muscle cells from the ureter of the guinea-pig. *J Physiol* **427**, 301-324.
- Ishihama H, Momota Y, Yanase H, Wang X, de Groat WC & Kawatani M. (2006). Activation of α_{1D} adrenergic receptors in the rat urothelium facilitates the micturition reflex. *J Urol* **175**, 358-364.
- Jackson-Weaver O, Osmond JM, Riddle MA, Naik JS, Gonzalez Bosc LV, Walker BR & Kanagy NL. (2013). Hydrogen sulfide dilates rat mesenteric arteries by activating endothelial large-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels and smooth muscle Ca^{2+} sparks. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **304**, H1446-1454.
- Jezior JR, Brady JD, Rosenstein DI, McCammon KA, Miner AS & Ratz PH. (2001). Dependency of detrusor contractions on calcium sensitization and calcium entry through LOE-908-sensitive channels. *Br J Pharmacol* **134**, 78-87.
- Jiang B, Tang G, Cao K, Wu L & Wang R. (2010). Molecular mechanism for H_2S -induced activation of K_{ATP} channels. *Antioxid Redox Signal* **12**, 1167-1178.
- John H, Hauri D, Bangerter U & Elbadawi A. (2001). Ultrastructure of the trigone and its functional implications. *Urol Int* **67**, 264-271.
- Jung KJ, Jang HS, Kim JI, Han SJ, Park JW & Park KM. (2013). Involvement of hydrogen sulfide and homocysteine transsulfuration pathway in the progression of kidney fibrosis after ureteral obstruction. *Biochim Biophys Acta* **1832**, 1989-1997.
- Kabil O & Banerjee R. (2010). Redox biochemistry of hydrogen sulfide. *J Biol Chem* **285**, 21903-21907.
- Kajimura M, Fukuda R, Bateman RM, Yamamoto T & Suematsu M. (2010). Interactions of multiple gas-transducing systems: hallmarks and uncertainties of CO, NO, and H_2S gas biology. *Antioxid Redox Signal* **13**, 157-192.
- Kajioka S, Nakayama S, Asano H, Seki N, Naito S & Brading AF. (2008). Levchromakalim and MgGDP activate small conductance ATP-sensitive K^+ channels of K^+ channel pore 6.1/sulfonylurea receptor 2A in pig detrusor smooth muscle cells: uncoupling of cAMP signal pathways. *J Pharmacol Exp Ther* **327**, 114-123.
- Kanai A & Andersson KE. (2010). Bladder afferent signaling: recent findings. *J Urol* **183**, 1288-1295.

- Kanai A, Fry C, Hanna-Mitchell A, Birder L, Zabbarova I, Bijos D & Ikeda Y. (2014). Do we understand any more about bladder interstitial cells?-ICI-RS 2013. *Neurourol Urodyn* **33**, 573-576.
- Kaneko Y, Kimura Y, Kimura H & Niki I. (2006). L-cysteine inhibits insulin release from the pancreatic beta-cell: possible involvement of metabolic production of hydrogen sulfide, a novel gasotransmitter. *Diabetes* **55**, 1391-1397.
- Karicheti V & Christ GJ. (2001). Physiological roles for K⁺ channels and gap junctions in urogenital smooth muscle: implications for improved understanding of urogenital function, disease and therapy. *Curr Drug Targets* **2**, 1-20.
- Khan MA, Dashwood MR, Thompson CS, Mumtaz FH, Mikhailidis DP & Morgan RJ. (1999). Up-regulation of endothelin ET_A and ET_B receptors and down-regulation of nitric oxide synthase in the detrusor of a rabbit model of partial bladder outlet obstruction. *Urol Res* **27**, 445-453.
- Kimura H. (2013). Physiological role of hydrogen sulfide and polysulfide in the central nervous system. *Neurochem Int* **63**, 492-497.
- Kimura H. (2014). The physiological role of hydrogen sulfide and beyond. *Nitric Oxide* **41**, 4-10.
- Kimura K, Ito M, Amano M, Chihara K, Fukata Y, Nakafuku M, Yamamori B, Feng J, Nakano T, Okawa K, Iwamatsu A & Kaibuchi K. (1996). Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science* **273**, 245-248.
- Knight GE, Bodin P, De Groat WC & Burnstock G. (2002). ATP is released from guinea pig ureter epithelium on distension. *Am J Physiol Renal Physiol* **282**, F281-288.
- Koenitzer JR, Isbell TS, Patel HD, Benavides GA, Dickinson DA, Patel RP, Darley-Usmar VM, Lancaster JR, Doeller JE & Kraus DW. (2007). Hydrogen sulfide mediates vasoactivity in an O₂-dependent manner. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **292**, H1953-1960.
- Koh BH, Roy R, Hollywood MA, Thornbury KD, McHale NG, Sergeant GP, Hatton WJ, Ward SM, Sanders KM & Koh SD. (2012). Platelet-derived growth factor receptor- α cells in mouse urinary bladder: a new class of interstitial cells. *J Cell Mol Med* **16**, 691-700.
- Kolluru GK, Shen X, Bir SC & Kevil CG. (2013a). Hydrogen sulfide chemical biology: pathophysiological roles and detection. *Nitric Oxide* **35**, 5-20.
- Kolluru GK, Shen X & Kevil CG. (2013b). A tale of two gases: NO and H₂S, foes or friends for life? *Redox Biol* **1**, 313-318.
- Kołęda P & Pilecki W. (2014). Nature of interstitial cells of Cajal of the upper urinary tract. *Adv Clin Exp Med* **23**, 627-632.
- Kondo K, Bhushan S, King AL, Prabhu SD, Hamid T, Koenig S, Murohara T, Predmore BL, Gojon G, Wang R, Karusula N, Nicholson CK, Calvert JW & Lefer DJ. (2013). H₂S protects against pressure overload-induced heart failure via upregulation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* **127**, 1116-1127.

- Krichevsky VP, Pagala MK, Vaydovsky I, Damer V & Wise GJ. (1999). Function of M₃ muscarinic receptors in the rat urinary bladder following partial outlet obstruction. *J Urol* **161**, 1644-1650.
- Kubo S, Doe I, Kurokawa Y & Kawabata A. (2007a). Hydrogen sulfide causes relaxation in mouse bronchial smooth muscle. *J Pharmacol Sci* **104**, 392-396.
- Kubo S, Doe I, Kurokawa Y, Nishikawa H & Kawabata A. (2007b). Direct inhibition of endothelial nitric oxide synthase by hydrogen sulfide: contribution to dual modulation of vascular tension. *Toxicology* **232**, 138-146.
- Kullmann FA, Limberg BJ, Artim DE, Shah M, Downs TR, Contract D, Wos J, Rosenbaum JS & de Groat WC. (2009). Effects of β_3 -adrenergic receptor activation on rat urinary bladder hyperactivity induced by ovariectomy. *J Pharmacol Exp Ther* **330**, 704-717.
- Kunze A, Neuhaus J & Stolzenburg JU. (2006). Quantitative immunohistochemical study of the innervation of the guinea-pig lower urinary tract. *BJU Int* **98**, 424-429.
- Kurizaki Y, Ishizuka O, Imamura T, Ichino M, Ogawa T, Igawa Y, Nishizawa O & Andersson KE. (2011). Relation between expression of α_1 -adrenoceptor mRNAs in bladder mucosa and urodynamic findings in men with lower urinary tract symptoms. *Scand J Urol Nephrol* **45**, 15-19.
- Kühn R, Uckert S, Stief CG, Truss MC, Lietz B, Bischoff E, Schramm M & Jonas U. (2000). Relaxation of human ureteral smooth muscle in vitro by modulation of cyclic nucleotide-dependent pathways. *Urol Res* **28**, 110-115.
- Lang RJ, Davidson ME & Exintaris B. (2002). Pyeloureteral motility and ureteral peristalsis: essential role of sensory nerves and endogenous prostaglandins. *Exp Physiol* **87**, 129-146.
- Lang RJ, Hashitani H, Tonta MA, Bourke JL, Parkington HC & Suzuki H. (2010). Spontaneous electrical and Ca²⁺ signals in the mouse renal pelvis that drive pyeloureteric peristalsis. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **37**, 509-515.
- Lang RJ, Hashitani H, Tonta MA, Parkington HC & Suzuki H. (2007). Spontaneous electrical and Ca²⁺ signals in typical and atypical smooth muscle cells and interstitial cell of Cajal-like cells of mouse renal pelvis. *J Physiol* **583**, 1049-1068.
- Lang RJ, Tonta MA, Zoltkowski BZ, Meeker WF, Wendt I & Parkington HC. (2006). Pyeloureteric peristalsis: role of atypical smooth muscle cells and interstitial cells of Cajal-like cells as pacemakers. *J Physiol* **576**, 695-705.
- Large WA. (2002). Receptor-operated Ca²⁺-permeable nonselective cation channels in vascular smooth muscle: a physiologic perspective. *J Cardiovasc Electrophysiol* **13**, 493-501.
- Lecci A & Maggi CA. (2003). Peripheral tachykinin receptors as potential therapeutic targets in visceral diseases. *Expert Opin Ther Targets* **7**, 343-362.
- Lee HY, Bardini M & Burnstock G. (2000). Distribution of P2X receptors in the urinary bladder and the ureter of the rat. *J Urol* **163**, 2002-2007.

- Lewis SA. (2000). Everything you wanted to know about the bladder epithelium but were afraid to ask. *Am J Physiol Renal Physiol* **278**, F867-874.
- Li J, Yang L, Pu C, Tang Y, Yun H & Han P. (2013). The role of duloxetine in stress urinary incontinence: a systematic review and meta-analysis. *Int Urol Nephrol* **45**, 679-686.
- Li L, Whiteman M, Guan YY, Neo KL, Cheng Y, Lee SW, Zhao Y, Baskar R, Tan CH & Moore PK. (2008). Characterization of a novel, water-soluble hydrogen sulfide-releasing molecule (GYY4137): new insights into the biology of hydrogen sulfide. *Circulation* **117**, 2351-2360.
- Liang GH, Xi Q, Leffler CW & Jaggar JH. (2012). Hydrogen sulfide activates Ca^{2+} sparks to induce cerebral arteriole dilatation. *J Physiol* **590**, 2709-2720.
- Lim JJ, Liu YH, Khin ES & Bian JS. (2008). Vasoconstrictive effect of hydrogen sulfide involves downregulation of cAMP in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **295**, C1261-1270.
- Liu DH, Huang X, Meng XM, Zhang CM, Lu HL, Kim YC & Xu WX. (2014). Exogenous H_2S enhances mice gastric smooth muscle tension through S-sulfhydration of $\text{K}_{\text{v}}4.3$, mediating the inhibition of the voltage-dependent potassium current. *Neurogastroenterol Motil* **26**, 1705-1716.
- Lowry PS, Jerde TJ, Bjorling DE, Maskel JL & Nakada SY. (2005). Obstruction alters the effect of prostaglandin E2 on ureteral contractility. *J Endourol* **19**, 183-187.
- Lu W, Li J, Gong L, Xu X, Han T, Ye Y, Che T, Luo Y, Zhan R, Yao W, Liu K, Cui S & Liu C. (2014). H_2S modulates duodenal motility in male rats via activating TRPV1 and K_{ATP} channels. *Br J Pharmacol* **171**, 1534-1550.
- Maggi CA, Giuliani S, Meini S & Santicioli P. (1995). Calcitonin gene related peptide as inhibitory neurotransmitter in the ureter. *Can J Physiol Pharmacol* **73**, 986-990.
- Mansfield KJ, Liu L, Mitchelson FJ, Moore KH, Millard RJ & Burcher E. (2005). Muscarinic receptor subtypes in human bladder detrusor and mucosa, studied by radioligand binding and quantitative competitive RT-PCR: changes in ageing. *Br J Pharmacol* **144**, 1089-1099.
- Martin AF, Bhatti S, Pyne-Geithman GJ, Farjah M, Manaves V, Walker L, Franks R, Strauch AR & Paul RJ. (2007). Expression and function of COOH-terminal myosin heavy chain isoforms in mouse smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* **293**, C238-245.
- Martínez-Saénz A, Barahona MV, Orensanz LM, Recio P, Bustamante S, Benedito S, Carballido J, García-Sacristán A, Prieto D & Hernández M. (2011). Mechanisms involved in the nitric oxide independent inhibitory neurotransmission to the pig urinary bladder neck. *Neurourol Urodyn* **30**, 151-157.
- Martínez-Saénz A, Recio P, Orensanz LM, Fernandes VS, Martínez MP, Bustamante S, Carballido J, García-Sacristán A, Prieto D & Hernández M. (2011). Role of calcitonin gene-related peptide in inhibitory neurotransmission to the pig bladder neck. *J Urol* **186**, 728-735.

- Mastrangelo D, Baertschi AJ, Roatti A, Amherdt M & Iselin CE. (2003). Nitric oxide production within rat urothelial cells. *J Urol* **170**, 1409-1414.
- Mastrangelo D, Wisard M, Rohner S, Leisinger H & Iselin CE. (2000). Diclofenac and NS-398, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, decrease agonist-induced contractions of the pig isolated ureter. *Urol Res* **28**, 376-382.
- Masunaga K, Chapple CR, McKay NG, Yoshida M & Sellers DJ. (2010). The β_3 -adrenoceptor mediates the inhibitory effects of β -adrenoceptor agonists via the urothelium in pig bladder dome. *Neurourol Urodyn* **29**, 1320-1325.
- Matsumoto R, Otsuka A, Suzuki T, Shinbo H, Mizuno T, Kurita Y, Mugiya S & Ozono S. (2013). Expression and functional role of β_3 -adrenoceptors in the human ureter. *Int J Urol* **20**, 1007-1014.
- Matsumoto-Miyai K, Kagase A, Yamada E, Yoshizumi M, Murakami M, Ohba T & Kawatani M. (2011). Store-operated Ca^{2+} entry suppresses distention-induced ATP release from the urothelium. *Am J Physiol Renal Physiol* **300**, F716-720.
- McCloskey KD. (2011). Interstitial cells of Cajal in the urinary tract. *Handb Exp Pharmacol*, 233-254.
- Meshner AL. (2009). *Junqueira's Basic Histology, Text and Atlas*. McGraw-Hill Education, New York.
- Metzger R, Schuster T, Till H, Stehr M, Franke FE & Dietz HG. (2004). Cajal-like cells in the human upper urinary tract. *J Urol* **172**, 769-772.
- Michel MC. (2011). β -Adrenergic Receptor Subtypes in the Urinary Tract. *Handb Exp Pharmacol*, 307-318.
- Miyatake R, Tomiyama Y, Murakami M, Park YC & Kurita T. (2001). Effects of isoproterenol and butylscopolamine on the friction between an artificial stone and the intraureteral wall in anesthetized rabbits. *J Urol* **166**, 1083-1087.
- Monaghan KP, Johnston L & McCloskey KD. (2012). Identification of PDGFR α positive populations of interstitial cells in human and guinea pig bladders. *J Urol* **188**, 639-647.
- Moore KH, Ray FR & Barden JA. (2001). Loss of purinergic P2X₃ and P2X₅ receptor innervation in human detrusor from adults with urge incontinence. *J Neurosci* **21**, RC166.
- Morikawa T, Kajimura M, Nakamura T, Hishiki T, Nakanishi T, Yukutake Y, Nagahata Y, Ishikawa M, Hattori K, Takenouchi T, Takahashi T, Ishii I, Matsubara K, Kabe Y, Uchiyama S, Nagata E, Gadalla MM, Snyder SH & Suematsu M. (2012). Hypoxic regulation of the cerebral microcirculation is mediated by a carbon monoxide-sensitive hydrogen sulfide pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 1293-1298.
- Murakami M, Tomiyama Y, Hayakawa K, Akahane M, Ajisawa Y, Park YC, Ohnishi N, Sugiyama T & Kurita T. (2000). Effects of β -adrenergic stimulation on the acutely obstructed ureter in dogs. *J Pharmacol Exp Ther* **292**, 67-75.

- Mustafa AK, Gadalla MM & Snyder SH. (2009). Signaling by gasotransmitters. *Sci Signal* **2**, re2.
- Muzaffar S, Jeremy JY, Sparatore A, Del Soldato P, Angelini GD & Shukla N. (2008). H₂S-donating sildenafil (ACS6) inhibits superoxide formation and gp91phox expression in arterial endothelial cells: role of protein kinases A and G. *Br J Pharmacol* **155**, 984-994.
- Nakada SY, Jerde TJ, Bjorling DE & Saban R. (2001). In vitro contractile effects of neurokinin receptor blockade in the human ureter. *J Urol* **166**, 1534-1538.
- Nakahira Y, Hashitani H, Fukuta H, Sasaki S, Kohri K & Suzuki H. (2001). Effects of isoproterenol on spontaneous excitations in detrusor smooth muscle cells of the guinea pig. *J Urol* **166**, 335-340.
- Nakamura T, Kimura J & Yamaguchi O. (2002). Muscarinic M₂ receptors inhibit Ca²⁺-activated K⁺ channels in rat bladder smooth muscle. *Int J Urol* **9**, 689-696.
- O'Reilly BA, Kosaka AH, Chang TK, Ford AP, Popert R & McMahon SB. (2001). A quantitative analysis of purinoceptor expression in the bladders of patients with symptomatic outlet obstruction. *BJU Int* **87**, 617-622.
- Ogawa H, Takahashi K, Miura S, Imagawa T, Saito S, Tominaga M & Ohta T. (2012). H₂S functions as a nociceptive messenger through transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) activation. *Neuroscience* **218**, 335-343.
- Oger S, Behr-Roussel D, Gorny D, Bernabé J, Comperat E, Chartier-Kastler E, Denys P & Giuliano F. (2011). Effects of potassium channel modulators on myogenic spontaneous phasic contractile activity in human detrusor from neurogenic patients. *BJU Int* **108**, 604-611.
- Okamoto H, Prestwich SA, Asai S, Unno T, Bolton TB & Komori S. (2002). Muscarinic agonist potencies at three different effector systems linked to the M₂ or M₃ receptor in longitudinal smooth muscle of guinea-pig small intestine. *Br J Pharmacol* **135**, 1765-1775.
- Otsuka A, Shinbo H, Matsumoto R, Kurita Y & Ozono S. (2008). Expression and functional role of β -adrenoceptors in the human urinary bladder urothelium. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **377**, 473-481.
- Pandita RK, Mizusawa H & Andersson KE. (2000). Intravesical oxyhemoglobin initiates bladder overactivity in conscious, normal rats. *J Urol* **164**, 545-550.
- Parajuli SP, Hristov KL, Sullivan MN, Xin W, Smith AC, Earley S, Malysz J & Petkov GV. (2013). Control of urinary bladder smooth muscle excitability by the TRPM4 channel modulator 9-phenanthrol. *Channels (Austin)* **7**, 537-540.
- Parajuli SP & Petkov GV. (2013). Activation of muscarinic M₃ receptors inhibits large-conductance voltage- and Ca²⁺-activated K⁺ channels in rat urinary bladder smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **305**, C207-214.

- Park YC, Tomiyama Y, Hayakawa K, Akahane M, Ajisawa Y, Miyatake R, Kiwamoto H, Sugiyama T & Kurita T. (2000). Existence of a β_3 -adrenoceptor and its functional role in the human ureter. *J Urol* **164**, 1364-1370.
- Patacchini R, Santicioli P, Giuliani S & Maggi CA. (2004). Hydrogen sulfide H₂S stimulates capsaicin-sensitive primary afferent neurons in the rat urinary bladder. *Br J Pharmacol* **142**, 31-34.
- Patacchini R, Santicioli P, Giuliani S & Maggi CA. (2005). Pharmacological investigation of hydrogen sulfide H₂S contractile activity in rat detrusor muscle. *Eur J Pharmacol* **509**, 171-177.
- Peng YJ, Nanduri J, Raghuraman G, Souvannakitti D, Gadalla MM, Kumar GK, Snyder SH & Prabhakar NR. (2010). H₂S mediates O₂ sensing in the carotid body. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 10719-10724.
- Petkov GV. (2012). Role of potassium ion channels in detrusor smooth muscle function and dysfunction. *Nat Rev Urol* **9**, 30-40.
- Petkov GV, Heppner TJ, Bonev AD, Herrera GM & Nelson MT. (2001). Low levels of K_{ATP} channel activation decrease excitability and contractility of urinary bladder. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **280**, R1427-1433.
- Piper AS & Large WA. (2003). Multiple conductance states of single Ca²⁺-activated Cl⁻ channels in rabbit pulmonary artery smooth muscle cells. *J Physiol* **547**, 181-196.
- Polhemus DJ & Lefer DJ. (2014). Emergence of hydrogen sulfide as an endogenous gaseous signaling molecule in cardiovascular disease. *Circ Res* **114**, 730-737.
- Porpiglia F, Destefanis P, Fiori C & Fontana D. (2000). Effectiveness of nifedipine and deflazacort in the management of distal ureter stones. *Urology* **56**, 579-582.
- Prabhakar NR. (2012). Carbon monoxide (CO) and hydrogen sulfide (H₂S) in hypoxic sensing by the carotid body. *Respir Physiol Neurobiol* **184**, 165-169.
- Prieto D, Hernandez M, Rivera L, Ordaz E & Garcia-Sacristan A. (1993). Catecholaminergic innervation of the equine ureter. *Res Vet Sci* **54**, 312-318.
- Prieto D, Simonsen U, Martín J, Hernández M, Rivera L, Lema L, García P & García-Sacristán A. (1994). Histochemical and functional evidence for a cholinergic innervation of the equine ureter. *J Auton Nerv Syst* **47**, 159-170.
- Putney JW. (2011). Origins of the concept of store-operated calcium entry. *Front Biosci (Schol Ed)* **3**, 980-984.
- Rashid S, Heer JK, Garle MJ, Alexander SP & Roberts RE. (2013). Hydrogen sulphide-induced relaxation of porcine peripheral bronchioles. *Br J Pharmacol* **168**, 1902-1910.
- Rasouly HM & Lu W. (2013). Lower urinary tract development and disease. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* **5**, 307-342.

- Recio P, Barahona MV, Orensanz LM, Bustamante S, Martínez AC, Benedito S, García-Sacristán A, Prieto D & Hernández M. (2009). 5-hydroxytryptamine induced relaxation in the pig urinary bladder neck. *Br J Pharmacol* **157**, 271-280.
- Ribeiro AS, Fernandes VS, Martínez MP, López-Oliva ME, Barahona MV, Recio P, Martínez AC, Blaha I, Orensanz LM, Bustamante S, García-Sacristán A, Prieto D & Hernández M. (2014a). Pre- and post-junctional bradykinin B₂ receptors regulate smooth muscle tension to the pig intravesical ureter. *Neurourol Urodyn* doi: 10.1002/nau.22685.
- Ribeiro AS, Fernandes VS, Martínez MP, Martínez-Sáenz A, Pazos MR, Orensanz LM, Recio P, Bustamante S, Carballido J, García-Sacristán A, Prieto D & Hernández M. (2014b). Neuronal and non-neuronal bradykinin receptors are involved in the contraction and/or relaxation to the pig bladder neck smooth muscle. *Neurourol Urodyn* **33**, 558-565.
- Ribeiro AS, Fernandes VS, Martínez-Sáenz A, Martínez P, Barahona MV, Orensanz LM, Blaha I, Serrano-Margüello D, Bustamante S, Carballido J, García-Sacristán A, Prieto D & Hernández M. (2014c). Powerful relaxation of phosphodiesterase type 4 inhibitor rolipram in the pig and human bladder neck. *J Sex Med* **11**, 930-941.
- Robinson D & Cardozowan L. (2014). Urinary incontinence in the young woman: treatment plans and options available. *Womens Health (Lond Engl)* **10**, 201-217.
- Rong W & Burnstock G. (2004). Activation of ureter nociceptors by exogenous and endogenous ATP in guinea pig. *Neuropharmacology* **47**, 1093-1101.
- Roosen A, Wu C, Sui G, Chowdhury RA, Patel PM & Fry CH. (2009). Characteristics of spontaneous activity in the bladder trigone. *Eur Urol* **56**, 346-353.
- Ryu A, Thompson M, Venkatachalem S, Pabelick C & Prakash YS. (2009). Effect of hydrogen sulfide on [Ca²⁺]_i regulation in airway smooth muscle. *FASEB J* **23**, 83-85.
- Sadananda P, Vahabi B & Drake MJ. (2011). Bladder outlet physiology in the context of lower urinary tract dysfunction. *Neurourol Urodyn* **30**, 708-713.
- Sakamoto K, Suri D & Rajasekaran M. (2006). Characterization of muscarinic receptor subtypes in human ureter. *J Endourol* **20**, 939-942.
- Salloum FN, Chau VQ, Hoke NN, Abbate A, Varma A, Ockaili RA, Toldo S & Kukreja RC. (2009). Phosphodiesterase-5 inhibitor, tadalafil, protects against myocardial ischemia/reperfusion through protein-kinase g-dependent generation of hydrogen sulfide. *Circulation* **120**, S31-36.
- Sand C & Michel MC. (2014). Bradykinin contracts rat urinary bladder largely independently of phospholipase C. *J Pharmacol Exp Ther* **348**, 25-31.
- Santicioli P & Maggi CA. (1998). Myogenic and neurogenic factors in the control of pyeloureteral motility and ureteral peristalsis. *Pharmacol Rev* **50**, 683-722.

- Sauzeau V, Le Jeune H, Cario-Toumaniantz C, Smolenski A, Lohmann SM, Bertoglio J, Chardin P, Pacaud P & Loirand G. (2000). Cyclic GMP-dependent protein kinase signaling pathway inhibits RhoA-induced Ca^{2+} sensitization of contraction in vascular smooth muscle. *J Biol Chem* **275**, 21722-21729.
- Schneider T, Fetscher C, Krege S & Michel MC. (2004a). Signal transduction underlying carbachol-induced contraction of human urinary bladder. *J Pharmacol Exp Ther* **309**, 1148-1153.
- Schneider T, Hein P & Michel MC. (2004b). Signal transduction underlying carbachol-induced contraction of rat urinary bladder. I. Phospholipases and Ca^{2+} sources. *J Pharmacol Exp Ther* **308**, 47-53.
- Seth JH, Panicker JN & Fowler CJ. (2013). The neurological organization of micturition. *Handb Clin Neurol* **117**, 111-117.
- Sha L, Linden DR, Farrugia G & Szurszewski JH. (2013). Hydrogen sulfide selectively potentiates central preganglionic fast nicotinic synaptic input in mouse superior mesenteric ganglion. *J Neurosci* **33**, 12638-12646.
- Shibuya N & Kimura H. (2013). Production of hydrogen sulfide from D-cysteine and its therapeutic potential. *Front Endocrinol (Lausanne)* **4**, 87.
- Shibuya N, Koike S, Tanaka M, Ishigami-Yuasa M, Kimura Y, Ogasawara Y, Fukui K, Nagahara N & Kimura H. (2013). A novel pathway for the production of hydrogen sulfide from D-cysteine in mammalian cells. *Nat Commun* **4**, 1366.
- Shokeir AA. (2001). Renal colic: pathophysiology, diagnosis and treatment. *Eur Urol* **39**, 241-249.
- Sigala S, Dellabella M, Milanese G, Fornari S, Faccoli S, Palazzolo F, Peroni A, Mirabella G, Cunico SC, Spano P & Muzzonigro G. (2005). Evidence for the presence of α_1 adrenoceptor subtypes in the human ureter. *Neurourol Urodyn* **24**, 142-148.
- Sitdikova GF, Khaertdinov NN & Zefirov AL. (2011). Role of calcium and potassium channels in effects of hydrogen sulfide on frog myocardial contractility. *Bull Exp Biol Med* **151**, 163-166.
- Sivarajah A, Collino M, Yasin M, Benetti E, Gallicchio M, Mazzon E, Cuzzocrea S, Fantozzi R & Thiemermann C. (2009). Anti-apoptotic and anti-inflammatory effects of hydrogen sulfide in a rat model of regional myocardial I/R. *Shock* **31**, 267-274.
- Somlyo AP & Somlyo AV. (2003). Ca^{2+} sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev* **83**, 1325-1358.
- Streng T, Axelsson HE, Hedlund P, Andersson DA, Jordt SE, Bevan S, Andersson KE, Högestätt ED & Zygmunt PM. (2008). Distribution and function of the hydrogen sulfide-sensitive TRPA1 ion channel in rat urinary bladder. *Eur Urol* **53**, 391-399.
- Sui GP, Wu C & Fry CH. (2001). The electrophysiological properties of cultured and freshly isolated detrusor smooth muscle cells. *J Urol* **165**, 627-632.

- Sui JL & Kao CY. (1997). Roles of outward potassium currents in the action potentials of guinea pig ureteral myocytes. *Am J Physiol* **273**, C962-972.
- Sun YG, Cao YX, Wang WW, Ma SF, Yao T & Zhu YC. (2008). Hydrogen sulphide is an inhibitor of L-type calcium channels and mechanical contraction in rat cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* **79**, 632-641.
- Tang G, Wu L, Liang W & Wang R. (2005). Direct stimulation of K_{ATP} channels by exogenous and endogenous hydrogen sulfide in vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol* **68**, 1757-1764.
- Tang G, Wu L & Wang R. (2010). Interaction of hydrogen sulfide with ion channels. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **37**, 753-763.
- Tansey MG, Luby-Phelps K, Kamm KE & Stull JT. (1994). Ca²⁺-dependent phosphorylation of myosin light chain kinase decreases the Ca²⁺ sensitivity of light chain phosphorylation within smooth muscle cells. *J Biol Chem* **269**, 9912-9920.
- Teague B, Asiedu S & Moore PK. (2002). The smooth muscle relaxant effect of hydrogen sulphide in vitro: evidence for a physiological role to control intestinal contractility. *Br J Pharmacol* **137**, 139-145.
- Telezhkin V, Brazier SP, Cayzac SH, Wilkinson WJ, Riccardi D & Kemp PJ. (2010). Mechanism of inhibition by hydrogen sulfide of native and recombinant BKCa channels. *Respir Physiol Neurobiol* **172**, 169-178.
- Testa R, Guarneri L, Ibba M, Strada G, Poggesi E, Taddei C, Simonazzi I & Leonardi A. (1993). Characterization of α_1 -adrenoceptor subtypes in prostate and prostatic urethra of rat, rabbit, dog and man. *Eur J Pharmacol* **249**, 307-315.
- Thorneloe KS & Nelson MT. (2003). Properties and molecular basis of the mouse urinary bladder voltage-gated K⁺ current. *J Physiol* **549**, 65-74.
- Tominaga M, Wada M & Masu M. (2001). Potentiation of capsaicin receptor activity by metabotropic ATP receptors as a possible mechanism for ATP-evoked pain and hyperalgesia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 6951-6956.
- Tomiyama Y, Murakami M, Hayakawa K, Akiyama K, Yamazaki Y, Kojima M, Shibata N & Akahane M. (2003a). Pharmacological profile of KUL-7211, a selective β -adrenoceptor agonist, in isolated ureteral smooth muscle. *J Pharmacol Sci* **92**, 411-419.
- Tomiyama Y, Wanajo I, Yamazaki Y, Murakami M, Kojima M & Shibata N. (2003b). Functional muscarinic cholinergic receptors in the isolated canine ureter. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **367**, 348-352.
- Trevisani M, Patacchini R, Nicoletti P, Gatti R, Gazzieri D, Lissi N, Zagli G, Creminon C, Geppetti P & Harrison S. (2005). Hydrogen sulfide causes vanilloid receptor 1-mediated neurogenic inflammation in the airways. *Br J Pharmacol* **145**, 1123-1131.

- Tyagi P, Thomas CA, Yoshimura N & Chancellor MB. (2009). Investigations into the presence of functional β_1 , β_2 and β_3 -adrenoceptors in urothelium and detrusor of human bladder. *Int Braz J Urol* **35**, 76-83.
- Uckert S, Sigl K, Waldkirch ES, Sandner P, Ulbrich E, Oelke M, Stief CG & Kuczyk MA. (2009). Significance of phosphodiesterase isoenzymes in the control of human detrusor smooth muscle function. An immunohistochemical and functional study. *Urologe A* **48**, 764-769.
- Uckert S, Stief CG, Lietz B, Burmester M, Jonas U & Machtens SA. (2002). Possible role of bioactive peptides in the regulation of human detrusor smooth muscle - functional effects in vitro and immunohistochemical presence. *World J Urol* **20**, 244-249.
- Villalba N, Stankevicius E, Garcia-Sacristán A, Simonsen U & Prieto D. (2007). Contribution of both Ca^{2+} entry and Ca^{2+} sensitization to the α_1 -adrenergic vasoconstriction of rat penile small arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **292**, H1157-1169.
- Vishwajit S & Anderson KE. (2009). Terminology of lower urinary tract symptoms. Helpful or confusing? *ScientificWorldJournal* **9**, 17-22.
- Wang EC, Lee JM, Ruiz WG, Balestreire EM, von Bodungen M, Barrick S, Cockayne DA, Birder LA & Apodaca G. (2005). ATP and purinergic receptor-dependent membrane traffic in bladder umbrella cells. *J Clin Invest* **115**, 2412-2422.
- Wang HZ, Lee SW, Day NS & Christ GJ. (2001). Gap junction channel activity in cultured human bladder smooth muscle cell pairs: gating and unitary conductances. *Urology* **57**, 111.
- Wang R. (2012). Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed. *Physiol Rev* **92**, 791-896.
- Weiss R, Mevissen M, Hauser DS, Scholtysik G, Portier CJ, Walter B, Studer UE & Danuser H. (2002). Inhibition of human and pig ureter motility in vitro and in vivo by the K^+ channel openers PKF 217-744b and nicorandil. *J Pharmacol Exp Ther* **302**, 651-658.
- Wheeler MA, Ayyagari RR, Wheeler GL & Weiss RM. (2005). Regulation of cyclic nucleotides in the urinary tract. *J Smooth Muscle Res* **41**, 1-21.
- White BJ, Smith PA & Dunn WR. (2013). Hydrogen sulphide-mediated vasodilatation involves the release of neurotransmitters from sensory nerves in pressurized mesenteric small arteries isolated from rats. *Br J Pharmacol* **168**, 785-793.
- Whiteman M, Li L, Kostetski I, Chu SH, Siau JL, Bhatia M & Moore PK. (2006). Evidence for the formation of a novel nitrosothiol from the gaseous mediators nitric oxide and hydrogen sulphide. *Biochem Biophys Res Commun* **343**, 303-310.
- Wibberley A, Chen Z, Hu E, Hieble JP & Westfall TD. (2003). Expression and functional role of Rho-kinase in rat urinary bladder smooth muscle. *Br J Pharmacol* **138**, 757-766.

- Xin W, Li N, Cheng Q, Fernandes VS & Petkov GV. (2014a). Constitutive PKA activity is essential for maintaining the excitability and contractility in guinea pig urinary bladder smooth muscle: role of the BK channel. *Am J Physiol Cell Physiol* **307**, C1142-1150.
- Xin W, Li N, Cheng Q & Petkov GV. (2014b). BK channel-mediated relaxation of urinary bladder smooth muscle: a novel paradigm for phosphodiesterase type 4 regulation of bladder function. *J Pharmacol Exp Ther* **349**, 56-65.
- Xu H, Zisman AL, Coe FL & Worcester EM. (2013). Kidney stones: an update on current pharmacological management and future directions. *Expert Opin Pharmacother* **14**, 435-447.
- Xu M, Wu YM, Li Q, Wang X & He RR. (2008). Electrophysiological effects of hydrogen sulfide on pacemaker cells in sinoatrial nodes of rabbits. *Sheng Li Xue Bao* **60**, 175-180.
- Yamada S & Ito Y. (2011). α_1 -Adrenoceptors in the urinary tract. *Handb Exp Pharmacol*, 283-306.
- Yang G, Pei Y, Teng H, Cao Q & Wang R. (2011). Specificity protein-1 as a critical regulator of human cystathionine gamma-lyase in smooth muscle cells. *J Biol Chem* **286**, 26450-26460.
- Yang G, Sun X & Wang R. (2004). Hydrogen sulfide-induced apoptosis of human aorta smooth muscle cells via the activation of mitogen-activated protein kinases and caspase-3. *FASEB J* **18**, 1782-1784.
- Yang G, Wu L, Jiang B, Yang W, Qi J, Cao K, Meng Q, Mustafa AK, Mu W, Zhang S, Snyder SH & Wang R. (2008). H₂S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine gamma-lyase. *Science* **322**, 587-590.
- Yang W, Yang G, Jia X, Wu L & Wang R. (2005). Activation of K_{ATP} channels by H₂S in rat insulin-secreting cells and the underlying mechanisms. *J Physiol* **569**, 519-531.
- Yong QC, Choo CH, Tan BH, Low CM & Bian JS. (2010). Effect of hydrogen sulfide on intracellular calcium homeostasis in neuronal cells. *Neurochem Int* **56**, 508-515.
- Yoshimura N & Chancellor MB. (2003). Neurophysiology of lower urinary tract function and dysfunction. *Rev Urol* **5 Suppl 8**, S3-S10.
- Yoshimura N, Ogawa T, Miyazato M, Kitta T, Furuta A, Chancellor MB & Tyagi P. (2014). Neural mechanisms underlying lower urinary tract dysfunction. *Korean J Urol* **55**, 81-90.
- Yoshiyama M & de Groat WC. (2008). The role of vasoactive intestinal polypeptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the neural pathways controlling the lower urinary tract. *J Mol Neurosci* **36**, 227-240.
- Zhang Y, Tang ZH, Ren Z, Qu SL, Liu MH, Liu LS & Jiang ZS. (2013). Hydrogen sulfide, the next potent preventive and therapeutic agent in aging and age-associated diseases. *Mol Cell Biol* **33**, 1104-1113.

Zhang Z, Huang H, Liu P, Tang C & Wang J. (2007). Hydrogen sulfide contributes to cardioprotection during ischemia-reperfusion injury by opening K_{ATP} channels. *Can J Physiol Pharmacol* **85**, 1248-1253.

Zhao P, Huang X, Wang ZY, Qiu ZX, Han YF, Lu HL, Kim YC & Xu WX. (2009). Dual effect of exogenous hydrogen sulfide on the spontaneous contraction of gastric smooth muscle in guinea-pig. *Eur J Pharmacol* **616**, 223-228.

Zhao W & Wang R. (2002). H₂S-induced vasorelaxation and underlying cellular and molecular mechanisms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **283**, H474-480.

Zhao W, Zhang J, Lu Y & Wang R. (2001). The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous K_{ATP} channel opener. *EMBO J* **20**, 6008-6016.

VIII. ABSTRACT

TITLE: ROLE OF HYDROGEN SULFIDE IN THE URINARY BLADDER FUNCTION

INTRODUCTION: In addition to NO and CO, H₂S was proposed as the third endogenous gaseous transmitter (Wang, 2012). In mammalian tissue endogenous H₂S is synthesized from L-cysteine by the action of the pyridoxal-5'-phosphate dependent enzyme CSE or CBS (Zhao *et al.*, 2001; Wang, 2012). The CBS linked route is a predominant source of H₂S in the central nervous system, whereas CSE is the major enzyme for H₂S synthesis in the cardiovascular system (Kolluru *et al.*, 2013a; Kimura, 2014). H₂S exerts a wide range of peripheral biological actions, such as neurotransmission, insulin secretion regulation and a vasodilator effect (Wang, 2012). In the lower urinary tract H₂S donors produce smooth muscle contraction and relaxation. Thus, in the rat detrusor the H₂S donor NaHS produces contraction by stimulating capsaicin sensitive primary afferents, which releases tachykinins such as substance P or neurokinin A, possibly by activating the nonselective cation channel transient receptor potential vanilloid 1 or a related ion channel in the sensory nerves (Patacchini *et al.*, 2004, 2005). TRPA1 channel expression on C-fiber bladder afferents and urothelial cells, and the fact that intravesical TRPA1 channel activators initiate detrusor overactivity suggest a possible role for these channels in bladder sensory transduction (Streng *et al.*, 2008). TRPA1 immunoreactivity was also noted in nerve fibers distributed in suburothelial and muscular layers in the human urethra, where NaHS produces smooth muscle relaxation (Gratzke *et al.*, 2009).

The density of the autonomic nerve fibers increases progressively from the upper ureter towards the bladder (Prieto *et al.*, 1993; Prieto *et al.*, 1994). In the proximal ureter, electric active pacemaker cells generate pyeloureteric rhythmicity driving adjacent smooth muscle cells thus emphasizing the role of the interstitial cells of Cajal-like cells localized at this level (Rasouly & Lu, 2013). These cells are involved in conducting and amplifying pacemaker activity in the upper urinary tract, producing electrical slow-wave potentials favouring the propagation of ureteral peristaltic activity (Rasouly & Lu, 2013). In the distal ureter and ureterovesical junction, in contrast, there is a rich network of autonomic nerve fibers and numerous ganglion cells that play an important role in the coordination of the ureter and bladder activity at the ureterovesical junction (Prieto *et al.*, 1993; Prieto *et al.*, 1994; Hernández *et al.*, 1995). Thus, spontaneous peristaltic contractions of the upper ureter are initiated by a pacemaker activity at the renal pelvis and sustained essentially via myogenic mechanisms, whereas distal ureter

activity is mainly regulated by autonomic nervous system. In fact, an NO dependent, as well as a neurogenic component of unknown nature has also been reported in the non-adrenergic, non-cholinergic inhibitory transmission to the intravesical ureter (Hernández *et al.*, 1995; Hernández *et al.*, 1997).

The bladder neck is part of the urine bladder outflow region in which NO (Hernández *et al.*, 2007; Hernández *et al.*, 2008; Bustamante *et al.*, 2010) and several non NO mediators (Hernández *et al.*, 2006a; Hernández *et al.*, 2006b; Hernández *et al.*, 2009; Recio *et al.*, 2009; Martínez-Sáenz *et al.*, 2011; Arteaga *et al.*, 2012a; Fernandes *et al.*, 2012), such as adenosine 5'-triphosphate and 5-hydroxytryptamine, peptides such as vasoactive intestinal peptide, pituitary adenylate cyclaseactivating polypeptide 38, calcitonin gene-related peptide and endothelins, steroid hormones such as testosterone, and an unidentified nerve dependent component, are involved in NANC inhibitory neurotransmission. Knowledge of the mechanisms involved in the distal ureter and bladder neck smooth muscle relaxation is essential to provide useful therapeutic agents in the treatment of obstructive ureteral pathology produced by embedded calculi at the ureterovesical junction and in the vesico-ureteral reflux (Hernández *et al.*, 1995) and for relaxing the bladder outlet region during the voiding phase under pathophysiological conditions, such as urinary obstruction symptoms associated with benign prostatic hyperplasia (Fernandes *et al.*, 2012).

AIMS: The role of H₂S in the regulation of urinary bladder neck and intravesical ureter has not been previously addressed. We investigated the involvement of H₂S in nitric oxide independent inhibitory neurotransmission to the urinary bladder neck and intravesical ureter.

METHODS: Urinary bladder neck and intravesical ureter strips were processed for immunohistochemistry to detect the expression of the H₂S synthesis enzymes cystathionine γ -lyase (CSE) and cystathionine β -synthase (CBS), labeled with the neuronal marker PGP 9.5. Western blot were performed to confirm CSE and CBS expression. Spectrophotometric assays were used for the measurement of enzymatic production of H₂S. We also used electrical field stimulation and myographs for isometric force recordings and simultaneous measurement of intracellular Ca²⁺ and tension, to study the relaxation in response to endogenously released or exogenously applied H₂S.

RESULTS: Regarding the role of H₂S in the regulation of urinary bladder neck, we found Cystathionine γ -lyase and cystathionine β -synthase expression in nerve fibers distributed in the smooth muscle layer. Cystathionine γ -lyase and cystathionine β -synthase immunoreactive fibers were also identified around the small arteries supplying the bladder neck. Electrical field stimulation (2 to 16 Hz) evoked frequency dependent relaxation, which was decreased by DL-propargylglycine and abolished by tetrodotoxin, blockers of cystathionine γ -lyase and neuronal voltage gated Na⁺ channels, respectively. The cystathionine β -synthase inhibitor O-(carboxymethyl) hydroxylamine did not change nerve mediated responses. The H₂S donor GYY4137 (0.1 nM to 10 μ M) induced a potent concentration dependent relaxation, which was not modified neither by neuronal voltage gated Na⁺ channels, or cystathionine γ -lyase and cystathionine β -synthase blockade. On phenylephrine contracted preparations the relaxation induced by electrical field stimulation and GYY4137 was reduced by desensitizing capsaicin sensitive primary afferents with capsaicin, and the blockade of adenosine 5'-triphosphate-dependent K⁺ channels, cyclooxygenase and cyclooxygenase-1 with glibenclamide, indomethacin and SC560, respectively. Inhibition of vanilloid, transient receptor potential A1, transient receptor potential vanilloid 1, vasoactive intestinal peptide/pituitary adenylyl cyclaseactivating polypeptide and calcitonin gene-related peptide receptors with capsazepine, HC030031, AMG9810, PACAP₆₋₃₈ and CGRP₈₋₃₇, respectively, also decreased electrical field stimulation and GYY4137 responses. H₂S relaxation was not changed by guanylyl cyclase, protein kinase A, or Ca²⁺-activated or voltage-gated K⁺ channel inhibitors. GYY4137 inhibited the contractions induced by phenylephrine and by K⁺ enriched (80 mM) physiological saline solution. To a lesser extent it decreased the phenylephrine and K⁺-induced increases in intracellular Ca²⁺.

Concerning the role of H₂S in the regulation of the intravesical ureter, immunohistochemical assays showed a high CSE expression in the smooth muscle layer, as well as, a strong CSE-immunoreactivity within nerve fibres distributed along smooth muscle bundles. CBS expression, however, was not consistently observed. These results were confirmed by western blot assays. On ureteral strips precontracted with thromboxane A₂ analogue U46619, electrical field stimulation and GYY4137 evoked frequency- and concentration-dependent relaxations. CSE inhibition with DL-propargylglycine reduced electrical field stimulation -elicited responses and a combined blockade of both CSE and NO synthase with, DL-propargylglycine and L-

NOARG, respectively, greatly reduced such relaxations. Endogenous H₂S production rate was diminished in presence of DL-propargylglycine, rescued by addition of GYY4137 and was not changed by L-NOARG. Electrical field stimulation and GYY4137 relaxations were also reduced by capsaicin-sensitive primary afferents desensitization with capsaicin and blockade of adenosine 5'-triphosphate-dependent K⁺ channels, transient receptor potential A1, transient receptor potential vanilloid 1, vasoactive intestinal peptide/pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide and calcitonin gene-related peptide receptors with glibenclamide, HC030031, AMG9810, PACAP₆₋₃₈ and CGRP₈₋₃₇, respectively.

CONCLUSIONS: Our study provides morphological and functional evidences for the role of H₂S in the regulation of intravesical ureter and bladder neck smooth muscle tone. From all of these results we can conclude:

1. The neuronal H₂S, synthesized by the action of CSE enzyme, acting together with NO as a signaling molecule in the NANC inhibitory neurotransmission in the intravesical ureter and urinary bladder neck.
2. In the intravesical ureter, H₂S acts as a potent inhibitory neurotransmitter through a NO-independent mechanism, producing smooth muscle relaxation via K_{ATP} channel activation. H₂S also promotes the release of PACAP 38 and CGRP from CSPA through activation of TRPA1, TRPV1 and/or related ion channels in the sensory nerves.
3. In the urinary bladder neck, H₂S produces a potent relaxation involving the activation of K_{ATP} channels and [Ca²⁺]_i desensitization dependent mechanisms. H₂S also promotes the release of inhibitory neuropeptides, such as PACAP 38 or CGRP, as well as COX-1 pathway derived prostanoids from CSPA through the activation of TRPA1, TRPV1 and/or related ion channels in the sensory nerves.
4. H₂S donors and K_{ATP} channels agonists might be useful pharmacological tools in the obstructive ureteral pathology, in the vesico-ureteral reflux and, in the Lower Urinary Tract Symptoms associated with obstruction secondary to BPH.

